

2m11-2692.9

Université de Montréal

**INTERVENTIONS ANTIOXYDANTES CONTRE LE STRESS
OXYDATIF INDUIT PAR LE MPP⁺ OU LE FER DANS DEUX
MODÈLES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON**

par

Chantal Bémour

Département de nutrition

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en nutrition

Janvier 1999

©Chantal Bémour, 1999



P. 1
QU
145
U58
1999
V.006

Université de Montréal

MODÈLES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON
OXYDATIVE INDUIT PAR LE MPTP OU LE 6-OH DA NS DEUX
INTERVENTIONS ANTIOXYDANTES CONTRE LE STRESS



Université de Montréal

Bibliothèque



1999

1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**INTERVENTIONS ANTIOXYDANTES CONTRE LE STRESS
OXYDATIF INDUIT PAR LE MPP⁺ OU LE FER DANS DEUX
MODÈLES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON**

présenté par:
Chantal Bémour

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Suzanne Lussier-Cacan

Dr. Michèle Houde-Nadeau

Dr. Jane Montgomery

Mémoire accepté le: 99-04-29

SOMMAIRE

La maladie de Parkinson est un désordre neurodégénératif caractérisé par le tremblement au repos, la rigidité musculaire et la bradykinésie (mouvement ralenti). Il y a une perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire. Cette dernière est un noyau du mésencéphale responsable de la synthèse de la dopamine (DA), neurotransmetteur essentiel à la fonction motrice de l'organisme. La pathogénèse de la maladie de Parkinson est à ce jour inconnue mais plusieurs évidences suggèrent qu'elle est multifactorielle. Un des facteurs impliqués est le stress oxydatif qui se définit comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les mécanismes de défense naturels antioxydants de l'organisme.

Ce projet de maîtrise avait tout d'abord pour but de comparer le degré de stress oxydatif induit par deux substances susceptibles de provoquer des dommages semblables à ceux que l'on observe dans la maladie de Parkinson. Ces deux substances sont la neurotoxine, 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) et l'oxydant, chlorure de fer (FeCl₃).

Dans un deuxième temps, le projet de recherche visait à comparer l'efficacité de deux antioxydants, la vitamine E et le Trolox (analogue hydrosoluble de la vitamine E) par rapport aux réactions radicalaires induites par le MPP⁺ ou le fer, chez le rat.

Notre hypothèse de travail était la suivante : l'administration d'antioxydants devrait contrebalancer la production de radicaux libres et protéger les neurones dopaminergiques contre les effets toxiques du MPP⁺ ou du fer.

L'injection des antioxydants et/ou des toxines a été faite directement dans la substance noire de rats mâles Sprague-Dawley endormis. Les rats ont récupéré pendant une semaine et la microdialyse intrastriatale bilatérale fut pratiquée afin d'évaluer le degré de stress oxydatif et de neuroprotection. Le 4-hydroxybenzoate (4HBZ) fut injecté de façon intrapéritonéale au début de la microdialyse. L'addition du radical hydroxyle au 4HBZ forme le 3,4-dihydroxybenzoate (34DHB). La détection du 34DHB dans les microdialysats est un bon indice du stress oxydatif. La présence du 34DHB nous permettait de vérifier la première partie de l'hypothèse de travail. En ce qui a trait à la deuxième partie, à savoir s'il y a protection des neurones dopaminergiques une semaine après l'injection des différentes substances, l'infusion de MPP⁺ après une heure d'équilibration de la microdialyse fut pratiquée afin de provoquer la libération de la DA comme indice de l'intégrité de la voie nigro-striée.

L'analyse de la DA et de son métabolite, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétate (DOPAC) ainsi que du 34DHB et du 4HBZ a été effectuée par HPLC couplée à un détecteur électrochimique.

Les résultats démontrent que le modèle de parkinsonisme induit par le MPP⁺ ou par le fer entraîne une diminution des concentrations de DA et de DOPAC, suggérant un dommage à la voie nigro-striée. Seul le groupe injecté avec le MPP⁺ présente un rapport 34DHB/4HBZ augmenté, indiquant une hausse de la production de radicaux hydroxyles. La co-administration des antioxydants, chez les rats traités soit avec le MPP⁺ soit avec le fer, est neuroprotectrice, le Trolox étant légèrement plus efficace.

En conclusion, le MPP⁺ et le fer induisent un dommage semblable à la voie nigro-striée. Seulement le MPP⁺ augmente le stress oxydatif une semaine après son injection intranigrale, ce qui est compatible avec un processus continu. Ainsi, le modèle MPP⁺ reproduit mieux la maladie de Parkinson. L'intervention antioxydante est plus efficace contre l'effet du fer, suggérant la nécessité d'un dosage répété d'antioxydant contre le stress induit par le MPP⁺.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	i
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Dédicace	ix
Remerciements	x
Chapitre un: REVUE DE LITTÉRATURE	1
I.1. Pathogénèse de la maladie de Parkinson de type idiopathique	2
I.2. Hypothèses étiologiques du parkinsonisme.	6
I.2.1 Vieillessement	7
I.2.2 Génétique	7
I.2.3 Environnement	8
I.2.4 Toxines	8
I.2.4.1 Dopamine	8
I.2.4.2 Neuromélanine	11
I.2.4.3 6-hydroxydopamine	11
I.2.4.4 Excitotoxicité	13
I.2.4.5 MPTP/MPP	15
I.2.4.6 β -carbolines	17
I.2.4.7 Isoquinolines	21
I.2.5 Stress oxydatif, radicaux libres et théorie mitochondriale	24
I.2.5.1 Controverse de l'hypothèse du stress oxydatif	29
I.3 Apoptose versus nécrose	30
I.4 État actuel des connaissances par rapport à la maladie de Parkinson	33

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose .	31
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Localisation de la substance noire et de la voie nigro-striée	3
Figure 2: La voie nigro-striée	4
Figure 3: Principaux signes cliniques associés au parkinsonisme	5
Figure 4: Voies d'action de la dopamine	10
Figure 5: La peroxydation lipidique initiée par l'oxydation de la dopamine	12
Figure 6: Mécanisme d'excitotoxicité dû à la présence de quantité excessive de glutamate	14
Figure 7: Mécanisme d'action de MPP ⁺ et site d'action de MAO-B	16
Figure 8: Double action de MPP ⁺	18
Figure 9: Site d'inhibition de MPP ⁺ sur la chaîne respiratoire .	19
Figure 10: Modèle de chronicité relié au parkinsonisme idiopathique	20
Figure 11a: β -carbolines et MPTP/MPP ⁺	22
Figure 11b: L'activation du MPTP et des TIQs en MPP ⁺ et analogues	22
Figure 12: Fonction du complexe α -cétoglutarate relativement à la chaîne respiratoire	25
Figure 13: Séquence de formation des radicaux libres	27
Figure 14: Enzymes impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme	36
Figure 15: Régénération de la vitamine E par la vitamine C lors de l'oxydation des membranes	41
Figure 16: Sites d'action possibles de l' α -lipoate par rapport au stress oxydatif et à la maladie de Parkinson	44
Figure 17: Protocole expérimental	52
Figure 18: Sonde de microdialyse	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

34DHB	:	3,4-dihydroxybenzoate
4HBZ	:	4-hydroxybenzoate
6-OHDA	:	6-hydroxydopamine
AGPI	:	acide gras polyinsaturé
BC	:	β -carboline
COMT	:	catéchol-O-méthyltransférase
CoQ	:	coenzyme Q
DA	:	dopamine
DOPA	:	3,4-dihydroxyphénylalanine
DOPAC	:	3,4-dihydroxyphénylacétate
ERO	:	espèce réactive oxygénée
FeCl₃	:	chlorure de fer
GSH	:	glutathion réduit
GSSG	:	glutathion oxydé
GSHpx	:	glutathion peroxydase
H₂O₂	:	peroxyde d'hydrogène
HVA	:	acide homovanillique
L[•]	:	radical lipidique
LOH	:	acide hydroxyle
LOOH	:	acide gras libre hydroperoxyde
MAO-B	:	monoamine oxydase de type B
MPP⁺	:	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPPP	:	1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy-piperidine
MPTP	:	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
O₂⁻	:	anion superoxyde
[•]OH	:	radical hydroxyle
SOD	:	superoxyde dismutase
TIQ	:	tétrahydroisoquinoline

DÉDICACE

A tous ceux que j'aime

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dr. Jane Montgomery qui a si bien su me transmettre sa passion pour la recherche et qui m'a été d'un support incontestable. Je désire également remercier l'assistante de recherche du laboratoire, Line Ste-Marie qui m'a été d'une aide précieuse et qui m'a encouragée à persévérer tout au long de mes études. Ces deux personnes sont devenues des êtres chers dans ma vie.

Je désire remercier tout particulièrement ma famille qui a toujours été derrière moi et qui m'a encouragée dans toutes mes décisions. Je remercie spécialement Claude Coupal qui m'a convaincue que j'avais le potentiel de poursuivre aux études supérieures.

En terminant, je remercie chaleureusement l'amour de ma vie, Donald, qui est toujours là pour m'épauler et me faire sentir quelqu'un d'important. Merci Do de m'avoir endurée pendant ma rédaction.

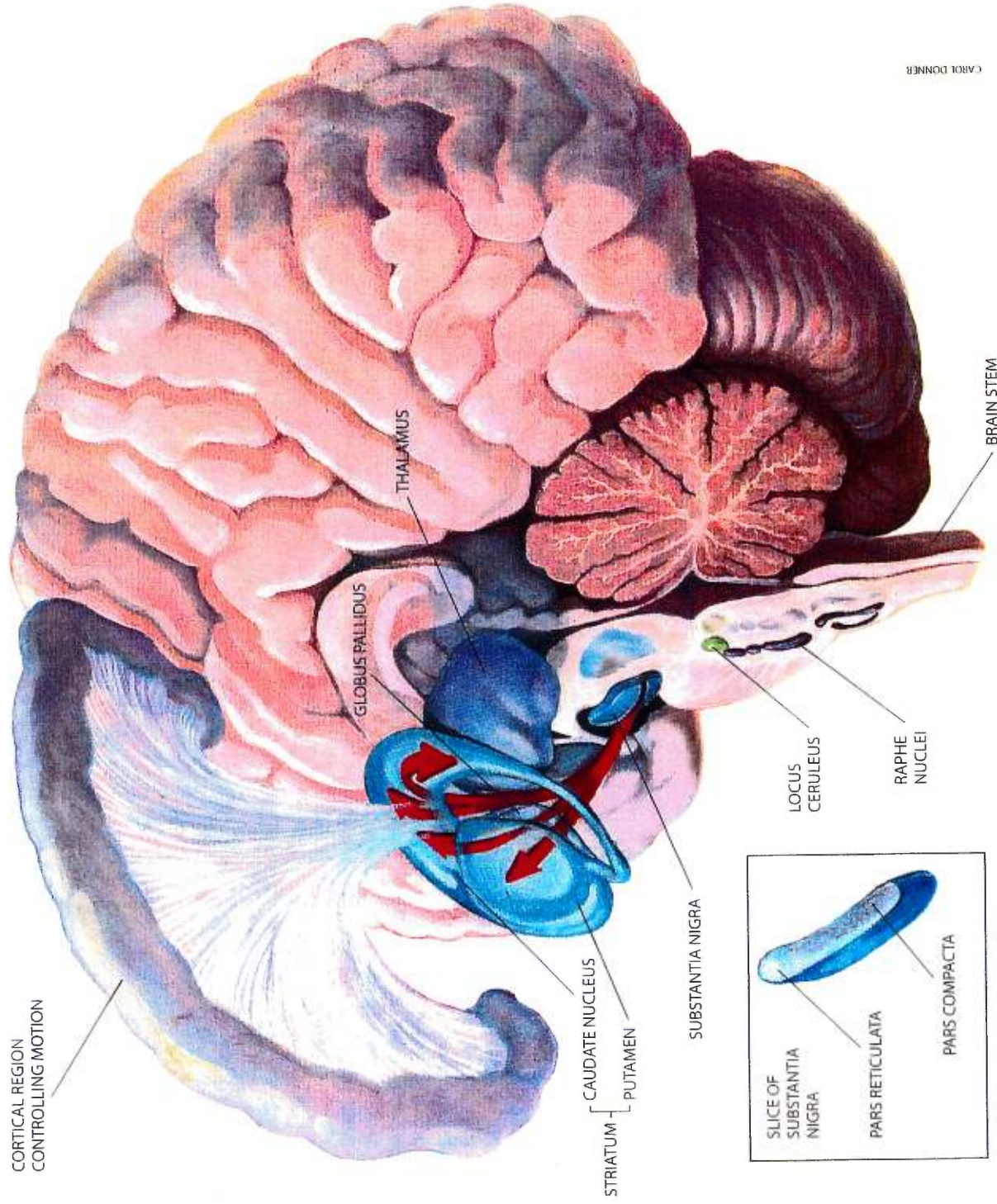
Chapitre un
REVUE DE LITTÉRATURE

I. 1. Pathogénèse de la maladie de Parkinson

Un des moments les plus émouvants des Jeux Olympiques d'Atlanta de 1996 s'est produit durant les cérémonies d'ouverture, avant même que ne débutent les Jeux. Le champion de boxe et médaillé d'or de 1960, Muhammed Ali, tenta d'allumer la flamme olympique de ses mains tremblantes. L'effort inhabituel qu'il dut déployer démontra au monde entier l'effet dévastateur du désordre dégénératif du système nerveux central qui affecte plus d'un demi million de gens aux États-Unis seulement et près de 1% de la population mondiale : la maladie de Parkinson⁽¹⁾.

Le parkinsonisme est caractérisé par la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire et de la voie nigro-striée (Figures 1 et 2)⁽¹⁾. La substance noire est un noyau du mésencéphale responsable de la synthèse de la dopamine, neurotransmetteur essentiel à la fonction motrice de l'organisme. Les signes cliniques associés à cette pathologie sont le tremblement au repos, la rigidité musculaire et la bradykinésie (mouvement ralenti) (Figure 3)⁽¹⁾. La dépression et la démence sont des signes non moteurs qui se manifestent à un stade relativement avancé de la maladie. De plus, des symptômes associés au dérangement du système nerveux autonome apparaissent : dysphagie, constipation, sialorrhée (sécrétion excessive de salive), séborrhée (sécrétion excessive de sébum), hypotension posturale et perturbations du cycle urinaire⁽²⁾.

Les symptômes de ce désordre neurologique apparaissent lorsqu'environ 80% de la fonction dopaminergique de la substance noire est détruite⁽³⁾. Le fait qu'aucun signe clinique ne se manifeste avant que la majorité des neurones ne soit détruit est dû à l'accroissement de



CAROL DONNER

Figure 1: Localisation de la substance noire (Youdim et coll., 1997)

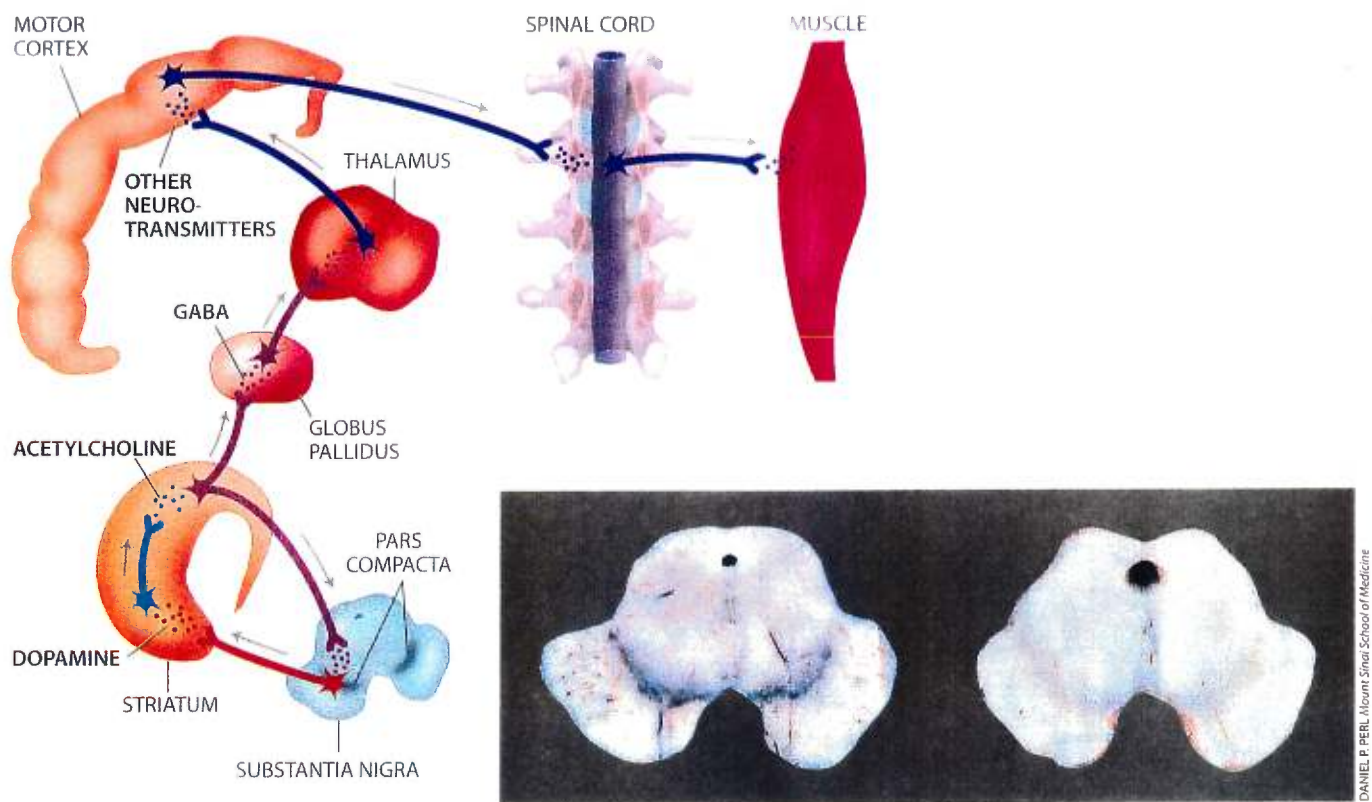
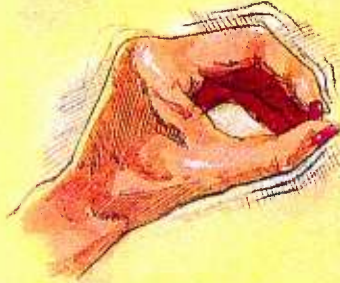
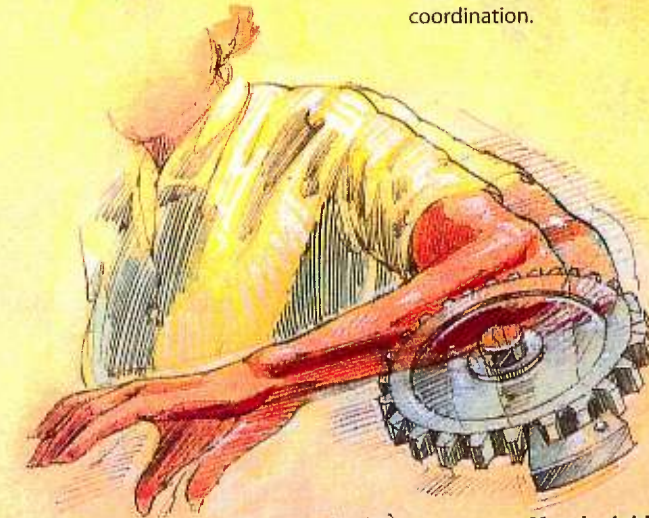
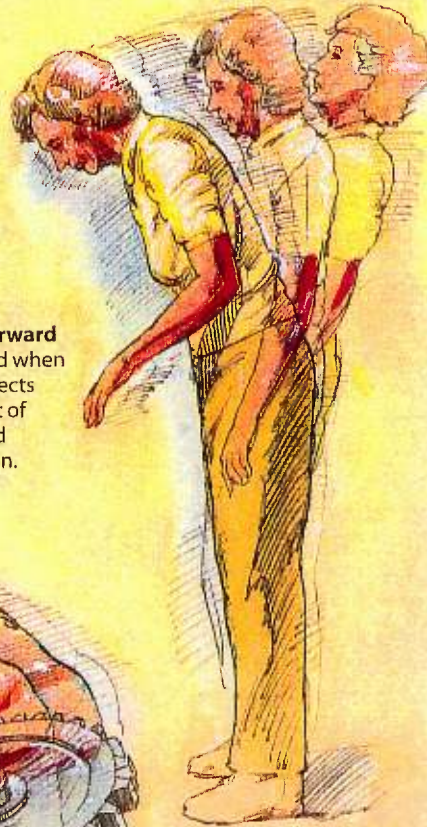


Figure 2: La voie nigro-striée
(Youdim et coll., 1997)

Rhythmic tremor often occurs at first in one hand, where it resembles the motion of rolling a pill between the thumb and forefinger.



Leaning forward or backward when upright reflects impairment of balance and coordination.



Muscle rigidity shows itself in the cogwheel phenomenon: pushing on an arm causes it to move in jerky increments instead of smoothly.

Difficulty rising from a sitting position is a common sign of disordered control over movement. Some patients report feelings of weakness and of being restrained by ropes or other external forces.



Shrinkage of handwriting is a symptom in some people. The samples show writing when a patient's medicine was working (top) and when it was not (bottom).

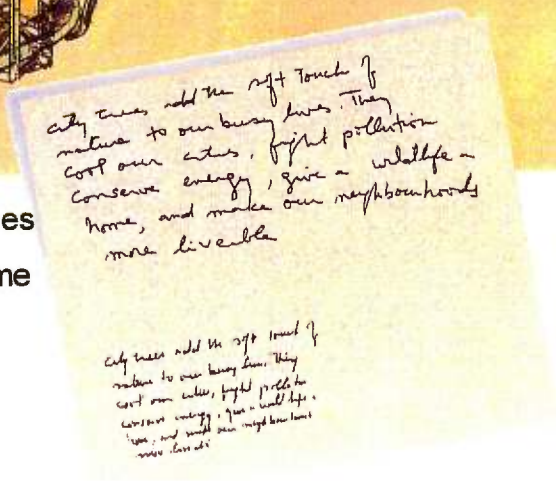


Figure 3: Principaux signes cliniques associés au parkinsonisme (Youdim et coll., 1997)

l'activité des cellules nerveuses non affectées (effet compensatoire) et à l'hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques^(4;5).

La pathogénèse exacte de la maladie de Parkinson est à ce jour inconnue mais plusieurs évidences nous laissent croire qu'elle est multifactorielle. Le vieillissement, l'environnement et l'hérédité ne sont que quelques exemples de facteurs susceptibles d'être responsables de l'apparition et du développement du parkinsonisme⁽⁶⁾.

I. 2. Hypothèses étiologiques du parkinsonisme

Avant de discuter des différentes hypothèses étiologiques étudiées à ce jour, il est primordial d'introduire un concept de première importance relié à l'apparition de la maladie de Parkinson. En effet, il existe une controverse au sujet de la neurodégénération observée dans le parkinsonisme. Fait-elle suite à un processus qui s'installe de façon progressive dans le système nerveux ou à un événement ponctuel?⁽⁷⁾ La réponse à cette question influencera les approches concernant les traitements ou la prévention reliés au parkinsonisme. Les principales hypothèses considérées dans ce mémoire seront traitées en fonction de cette controverse. Il existe donc un ensemble de causes possibles qui tentent d'expliquer l'étiologie de la maladie de Parkinson :

2.1 Vieillesse

2.2 Génétique

2.3 Environnement

2.4 Toxines

2.5 Stress oxydatif, radicaux libres et théorie mitochondriale

Le stress oxydatif qui se définit comme un processus faisant suite à un déséquilibre entre les mécanismes naturels de défense antioxydants et la production des radicaux libres fait le lien avec toutes les autres hypothèses émises dans ce mémoire. Les radicaux libres sont impliqués dans le vieillissement, l'aspect génétique, l'environnement et les toxines, tous reliés à la maladie de Parkinson. Cette dernière pourrait être le résultat de facteurs exogènes ou endogènes agissant sur les individus vulnérables⁽⁶⁾. La discussion qui suit portera sur ces facteurs.

2.1 Vieillesse

Le vieillissement pourrait élucider une partie de la cause du développement du parkinsonisme. En effet, le vieillissement de l'organisme entraîne des changements morphologiques et chimiques au niveau du système nerveux central^(5,8). L'analyse histologique de cerveaux de personnes âgées décédées révèle une perte neuronale au niveau de plusieurs régions du cerveau dont la substance noire⁽⁹⁾. Ainsi, il y a une diminution progressive de la quantité de dopamine et une augmentation des cellules gliales (cellules de soutien du système nerveux central)⁽¹⁰⁾. Cette perte neuronale est liée à différents aspects du vieillissement : formation accrue de radicaux libres, croisements moléculaires, mutations somatiques, accumulation d'information unique au niveau du génome et mécanismes excitotoxiques⁽¹¹⁾. L'hypothèse du vieillissement est fort probablement liée à un ou des processus qui s'installent de façon progressive plutôt qu'à un événement ponctuel.

2.2 Génétique

La composante génétique serait également en cause dans le parkinsonisme. Des études ont révélé la présence d'un mode de

transmission autosomal dominant dans 5 à 10% des cas de la maladie de Parkinson⁽¹²⁾. De plus, des marqueurs génétiques sur le chromosome 4q21-q23 ont été reliés au phénotype du parkinsonisme^(13;14). La possibilité que le facteur génétique puisse générer une susceptibilité à une toxine particulière n'est pas exclue⁽¹²⁾.

2.3 Environnement

Un autre facteur mis en cause dans la maladie de Parkinson est l'environnement. En effet, des études épidémiologiques ont démontré qu'il existe un risque accru de développer la maladie de Parkinson associé à des expositions environnementales. L'industrialisation, l'utilisation de pesticides, vivre dans un environnement rural ou le fait de boire l'eau provenant directement d'un puits en seraient des exemples^(6;15). La diversité des facteurs environnementaux suggère que l'environnement n'est pas un facteur-clé dans l'étiologie de la maladie de Parkinson.

2.4 Toxines

Les toxines, qu'elles soient de nature exogène ou endogène, pourraient contribuer de façon importante à la pathogénèse du parkinsonisme. Nous discuterons de quelques toxines jugées importantes dans la maladie de Parkinson.

2.4.1 Dopamine

La dopamine est une catécholamine et un neurotransmetteur de première importance pour la fonction motrice de l'organisme. Les différentes voies d'action de la dopamine sont décrites à la figure 4⁽¹⁶⁾. Ce neurotransmetteur est synthétisé dans le neurone dopaminergique à partir de l'acide aminé tyrosine. Ce dernier est transformé en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase. La

L-DOPA est ensuite transformée en dopamine par l'enzyme DOPA décarboxylase. La dopamine est par la suite entreposée dans des vésicules, endroit où elle est inerte.

Lorsque le neurone dopaminergique est stimulé, la dopamine est libérée dans la fente synaptique. La dopamine peut ainsi agir de plusieurs façons. Tout d'abord, elle peut se lier à des récepteurs situés sur le neurone post-synaptique afin d'accomplir la transmission neuronale. La dopamine peut également être inactivée par l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui serait localisée à l'extérieur du neurone. L'action concertée des enzymes COMT et monoamine oxydase (MAO) mènerait à la synthèse de l'acide homovanillique (HVA). La dopamine peut aussi subir une autoxydation. Toutes ces voies entraînent la production de peroxyde d'hydrogène, lequel pourrait être transformé en radical hydroxyle, un radical libre extrêmement réactif.

Une certaine quantité de la dopamine libérée dans la fente synaptique peut être finalement recaptée par le neurone pré-synaptique. Une fois à l'intérieur du neurone pré-synaptique, la dopamine peut être soit entreposée de nouveau dans les vésicules ou soit dégradée par l'enzyme mitochondriale MAO. L'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) est le produit de l'action de la MAO et de l'aldéhyde oxydase sur la dopamine. Plusieurs agents pharmacologiques agissent sur le métabolisme de la dopamine (Figure 4). Ceci permet donc de manipuler les voies dopaminergiques afin de mieux les comprendre.

L'hypothèse de la toxicité de la dopamine stipule que le renouvellement (turnover) accru de la dopamine durant les stades précoces de la maladie de Parkinson provoque la formation excessive de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier serait normalement inactivé par le glutathion

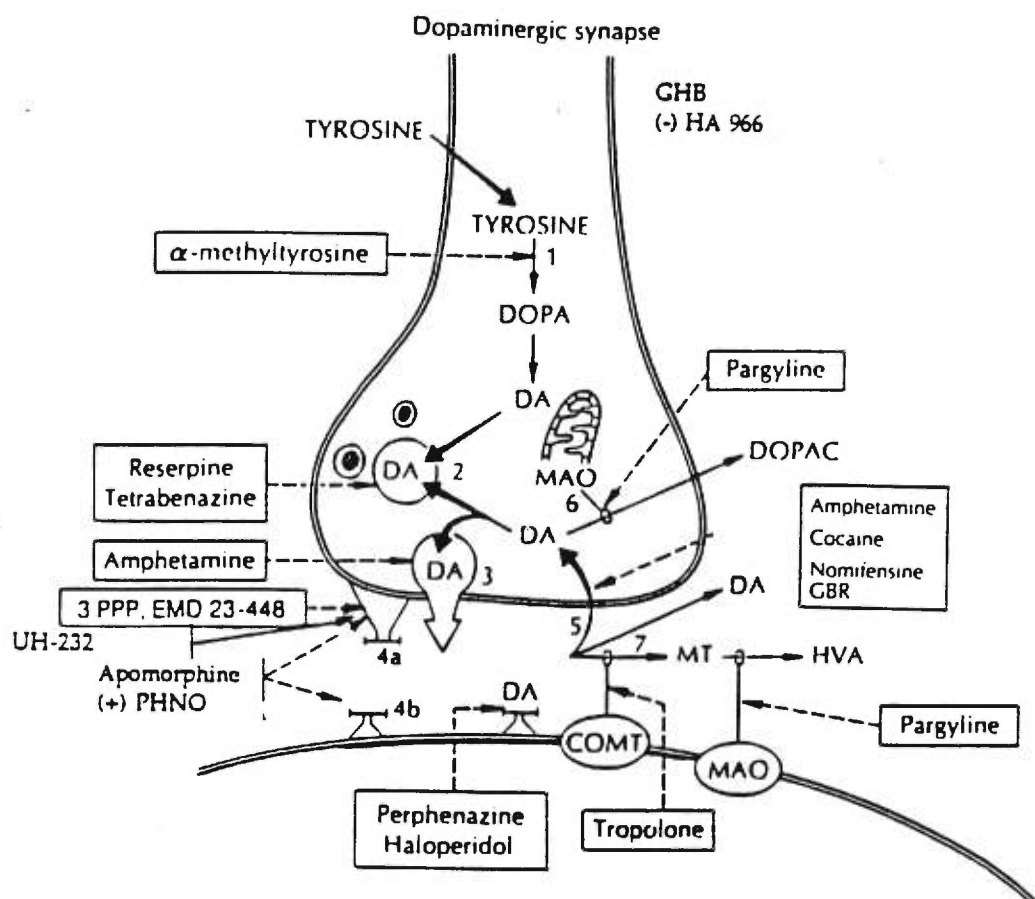


Figure 4: Voies d'action de la dopamine
(Cooper et coll., 1996)

(GSH) dans une réaction catalysée par l'enzyme glutathion peroxydase et par la catalase. Cependant, des études ont démontré que ce mécanisme de défense antioxydant peut être altéré chez les parkinsoniens (voir section 4.3.1 c). C'est ainsi que l'excès de peroxyde d'hydrogène peut être converti en radical hydroxyle par la réaction de Fenton, ce qui initie la peroxydation lipidique, le stress oxydatif et la mort cellulaire⁽¹²⁾ (Figure 5). Un cercle vicieux se développe ainsi de nouveau. Le paradoxe de la dopamine comme neurotransmetteur essentiel à la fonction motrice de l'organisme mais aussi comme toxine endogène reliée à la maladie de Parkinson est illustré.

2.4.2 Neuromélanine

Dans la substance noire du cerveau humain, les produits d'oxydation de la dopamine polymérisent de façon enzymatique ou via l'autoxydation afin de former la neuromélanine. Cette dernière est un composé pigmenté de la substance noire qui lui confère d'ailleurs sa couleur et dont la fonction exacte demeure une énigme⁽¹⁷⁾. La neuromélanine agit en tant que réservoir de certaines toxines exogènes, comme le MPP⁺. Les granules de neuromélanine sont un important site d'accumulation de métaux comme le fer⁽⁴⁾. De plus, le contenu en fer et en neuromélanine augmente avec l'âge, ce qui favorise l'action oxydative et la production des radicaux libres⁽¹⁸⁾. Certaines études ont suggéré que la formation du complexe neuromélanine-fer dans la substance noire entraînerait la dégénérescence neuronale par apoptose chez les parkinsoniens⁽¹⁷⁾.

2.4.3 6-hydroxydopamine

Cette catécholamine agit en tant que pseudo-neurotransmetteur et pourrait être formée de façon endogène. La 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est un dérivé oxydé de la dopamine qui entraîne une destruction

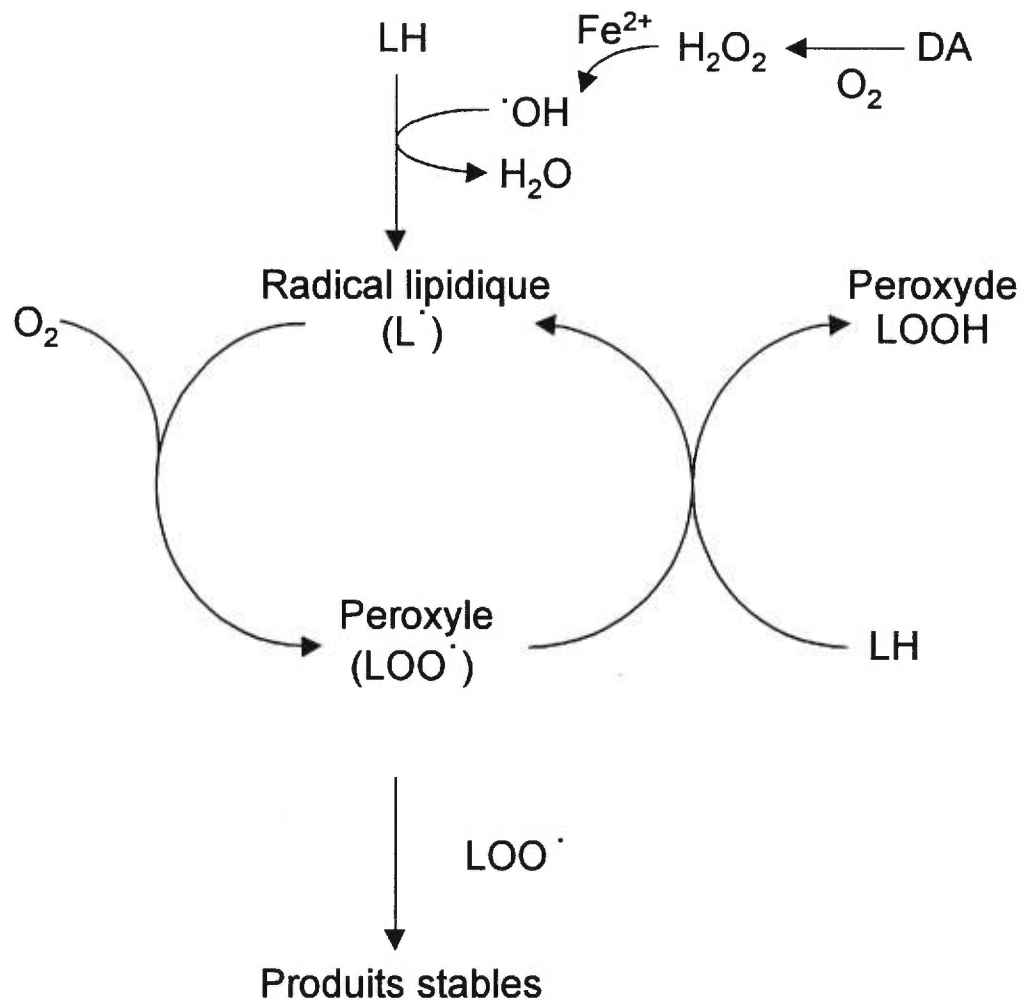


Figure 5: La peroxydation lipidique initiée par l'oxydation de la dopamine (Yoshikawa, 1993)

sélective des nerfs catécholaminergiques périphériques⁽¹⁹⁾. Ce processus aurait lieu via une réaction d'oxydation spontanée afin de produire des espèces de type quinone potentiellement toxiques⁽¹⁹⁾. Contrairement à la dopamine, la 6-OHDA est très instable⁽²⁰⁾. Cette instabilité pourrait donc engendrer un certain stress oxydatif et ainsi altérer la composition de plusieurs cellules dont les fonctions physiologiques sont primordiales comme les neurones dopaminergiques.

2.4.4 Excitotoxicité

L'excitotoxicité se définit comme étant une excitation excessive induite par des neurotransmetteurs de type acide aminé comme le glutamate et l'aspartate, processus pouvant causer la mort neuronale par plusieurs mécanismes dont le stress oxydatif.⁽²¹⁾ Le glutamate et l'aspartate deviennent cytotoxiques s'ils sont libérés en quantité excessive puisqu'ils entraînent la formation de radicaux libres et une altération de la fonction mitochondriale (Figure 6)⁽¹¹⁾. Les neurotransmetteurs excitatoires sont catabolisés dans la mitochondrie lors du cycle de l'acide citrique; une déficience en transaminase (enzyme responsable de leur transformation en intermédiaires du cycle de Krebs) peut donc entraîner une toxicité⁽⁵⁾. La littérature suggère également que les radicaux libres peuvent contribuer à l'excitotoxicité⁽⁵⁾. L'analyse de cerveaux de gens atteints de parkinsonisme de type idiopathique révèle un taux élevé du ratio cystéine/sulfate⁽⁵⁾. Ce ratio élevé indique un métabolisme erroné de la cystéine qui peut alors exercer une toxicité de type excitatoire. La cystéine induit un stress oxydatif qui pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de la maladie de Parkinson.

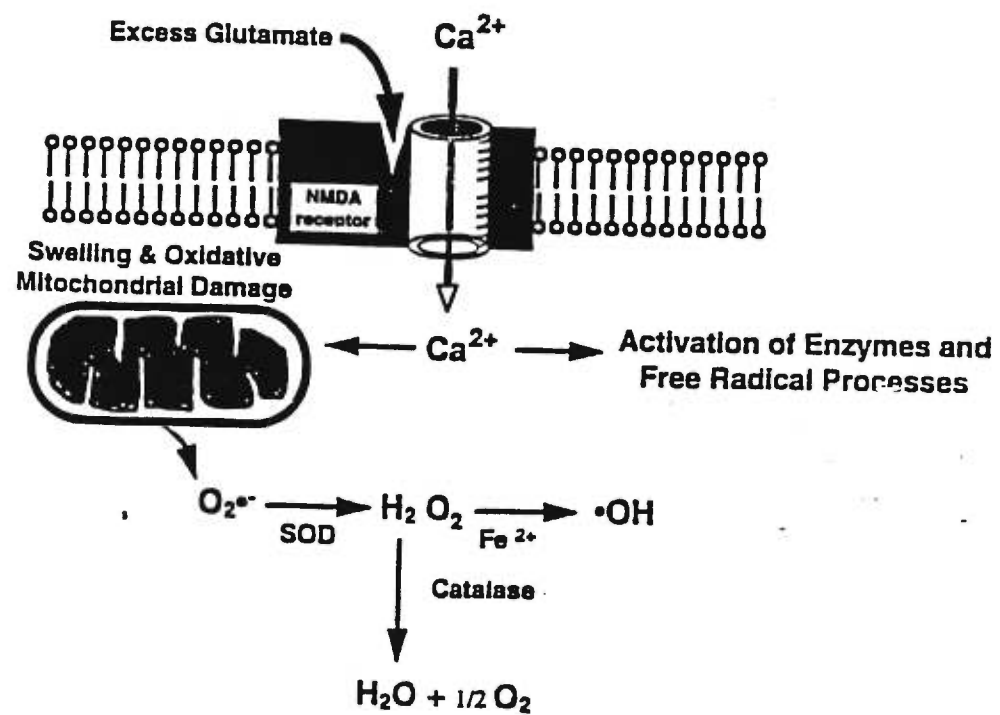


Figure 6: Mécanisme d'excitotoxicité dû à la présence de quantité excessive de glutamate (Packer et coll., 1997)

2.4.5 MPTP/MPP⁺

En 1977, un collégien de 23 ans se présente à l'urgence d'un hôpital américain avec une maladie soudaine qui troubla les médecins. Ses mains étaient tremblantes, son visage immobile et inexpressif, ses mouvements saccadés, rigides et très lents. De plus, le jeune homme ne pouvait parler. Il était toxicomane. Si on avait ajouté 40 ans à son âge, le diagnostic aurait été très clair : rigidité musculaire, tremblement, lenteur des mouvements, tous symptômes de la maladie de Parkinson. Le jeune homme répondit positivement au traitement à la L-DOPA (médicament couramment utilisé pour traiter le parkinsonisme, voir section 4.4.1). L'histoire démontra que le collégien avait tenté de synthétiser lui-même un analogue de l'héroïne. (La synthèse « maison » de drogues était très populaire à l'époque). Cependant, le composé qu'il désirait était le 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy-piperidine (MPPP), chimiquement semblable au Demerol (narcotique puissant). Les étapes à suivre dans la fabrication du MPPP devaient être exécutées de façon très précise. Une erreur s'étant glissée dans le processus entraîna la synthèse d'un composé analogue mais extrêmement toxique : le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP). C'est ainsi que le MPTP et le MPP⁺ furent découverts et devinrent des composés utiles pour l'étude des mécanismes reliés à la pathogénèse de la maladie de Parkinson⁽²²⁻²⁴⁾.

La pro-neurotoxine MPTP, substance liposoluble, est oxydée en 1-méthyl-4-phényl-pyridinium (MPP⁺), substance hydrosoluble, par le biais de l'enzyme monoamine oxydase de type B (MAO-B)⁽²⁴⁾ (Figure 7)⁽²²⁾.

Le MPP⁺ est le composé qui exerce une action destructrice sur les neurones dopaminergiques de la substance noire et produit donc des effets très semblables à ceux observés chez les parkinsoniens de type

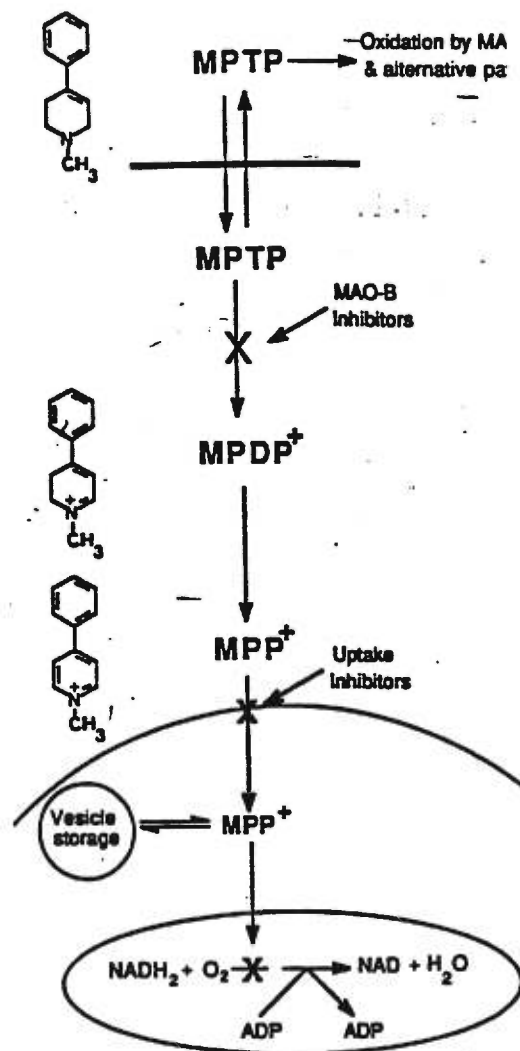


Figure 7: Mécanisme d'action de MPP⁺ et site d'action de MAO-B
(Tipton et coll., 1993)

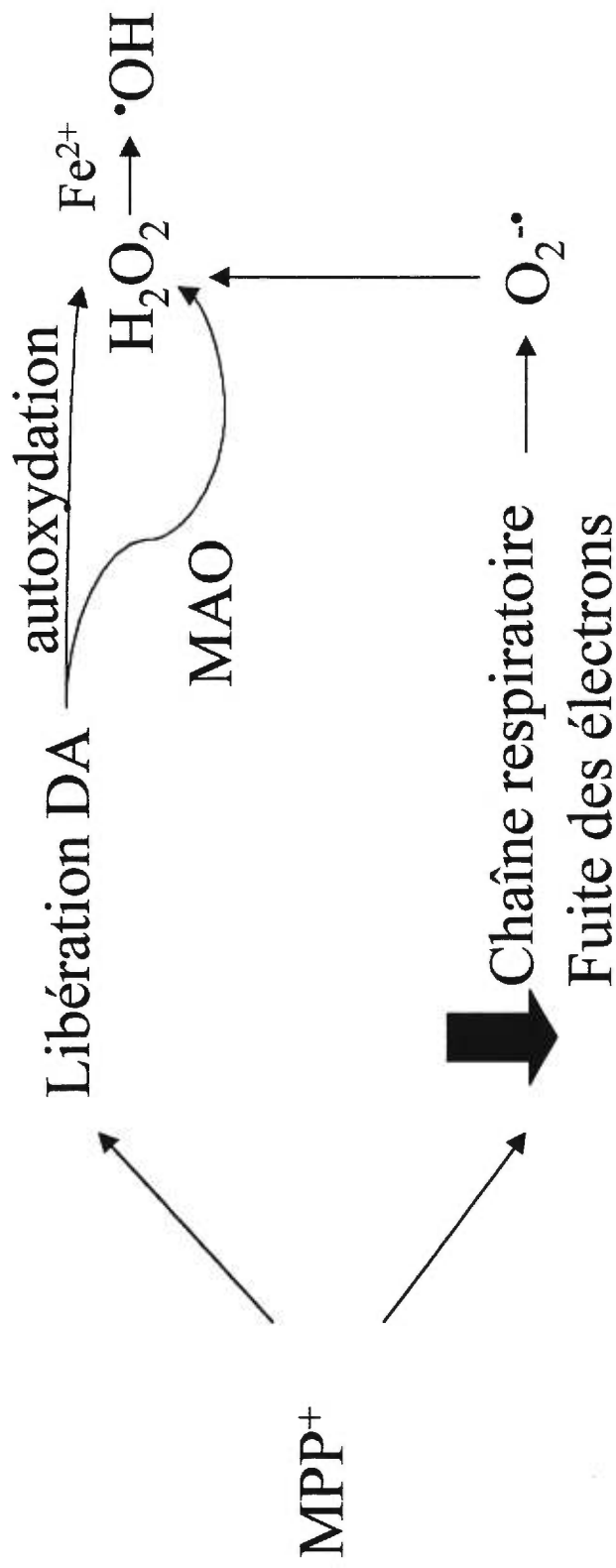
idiopathique⁽²³⁾. En effet, le MPP⁺ étant hydrosoluble s'accumule dans la mitochondrie et inhibe la chaîne respiratoire au complexe I entraînant la production de radicaux libres de deux façons (Figure 8). Tout d'abord, par une voie impliquant la dopamine, c'est-à-dire sa libération induite par le MPP⁺ augmentant le métabolisme et l'autoxydation de la dopamine. Ensuite, par une voie impliquant la diminution de l'activité de la chaîne respiratoire ce qui entraîne une fuite des électrons et, de ce fait, une augmentation de la production de l'anion superoxyde (Figure 9)⁽³⁹⁾.

Le MPTP et le MPP⁺ sont extrêmement utiles pour l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson puisque ces molécules permettent d'obtenir un modèle expérimental impliquant un processus plutôt qu'un événement ponctuel. En effet, l'administration de MPP⁺ entraîne une destruction dopaminergique continue reflétant l'aspect chronique de la maladie de Parkinson de type idiopathique⁽²⁶⁾ (Figure 10)⁽⁴⁾. Cet aspect comporte une implication au niveau du traitement de la maladie de Parkinson, notion qui sera discutée plus en détail ultérieurement.

2.4.6 β -carbolines

Les β -carbolines (BCs) sont des molécules formées de façon endogène à partir de la condensation du tryptophane et de la tryptamine avec des composés carbonyles. Ces toxines sont également présentes dans certains aliments comme la bière, la viande et le poisson⁽²⁷⁾. Plusieurs études suggèrent que ces substances seraient les analogues « naturels » des toxines et protoxines de type MPTP⁽²⁸⁾. En effet, l'injection intranigrale d'analogues de β -carboline entraîne une dégénérescence de la substance noire et une diminution de la

Figure 8: Double action de MPP⁺



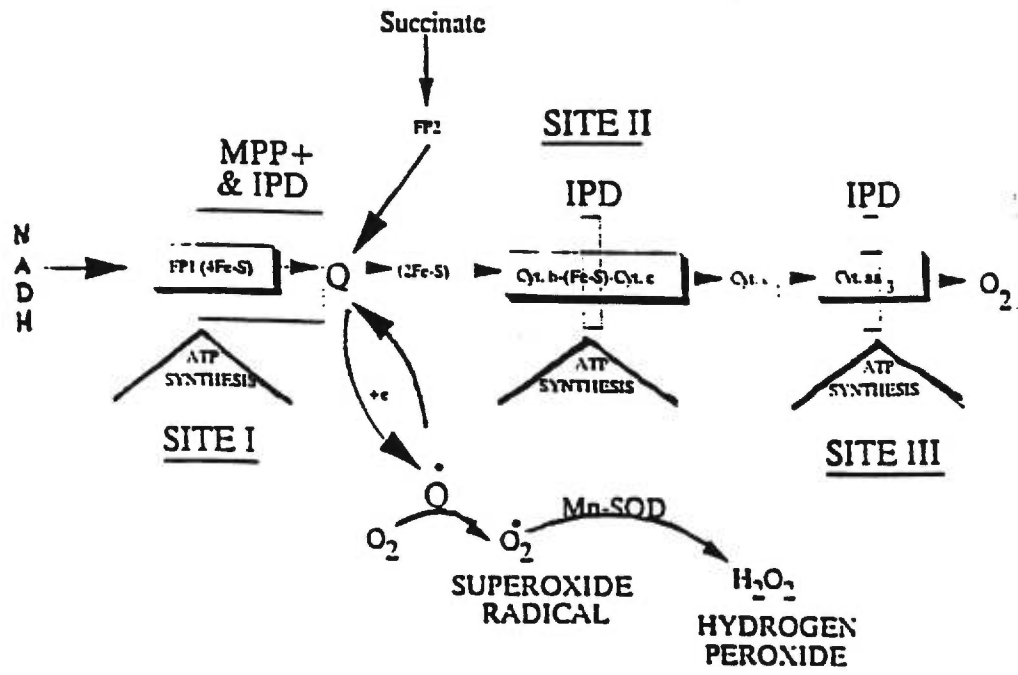


Figure 9: Site d'inhibition de MPP⁺ sur la chaîne respiratoire
(Poirier et coll., 1993)

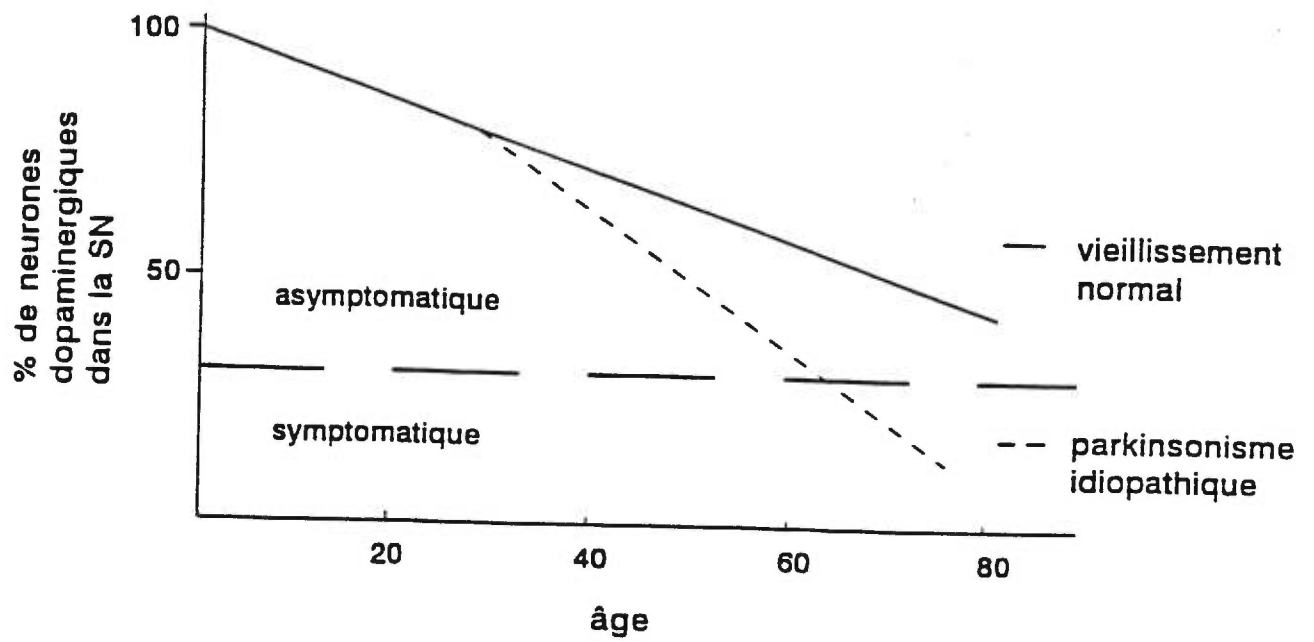


Figure 10: Modèle de chronicité relié au parkinsonisme idiopathique (Agid, 1993)

concentration de la dopamine et du DOPAC dans le striatum du rat.⁽²⁹⁾ L'enzyme β -carboline-2-N-méthyltransférase, présente dans le cerveau humain, catalyse l'activation des BCs par la méthylation afin de former les cations β -carbolinium (BC⁺s) de type 2-monométhylé (2-MeBC⁺s) et de type 2,9-diméthylé (2,9-Me₂BC⁺s). Ces derniers sont des analogues de la neurotoxine MPP⁺ comportant un lien azote et une charge positive (Figure 11a). Certaines études ont confirmé le contenu relativement plus élevé de 2,9-Me₂BC⁺ dans le liquide céphalo-rachidien de parkinsoniens comparativement à des sujets contrôles⁽²⁸⁾. Les BC⁺s empêchent la recapture de la dopamine par les neurones dopaminergiques en plus d'inhiber la chaîne respiratoire en inhibant la NADH déshydrogénase du complexe I⁽²⁸⁾. Ceci correspond à un stress oxydatif relié à une détresse respiratoire. Ces affirmations suggèrent le rôle possible des BCs relativement à la pathogénèse de la maladie de Parkinson, où on observe également une inhibition du complexe I⁽³⁰⁾.

2.4.7 Isoquinolines

Les isoquinolines sont des composés hétérocycliques que l'on retrouve dans le cerveau des êtres humains. Le fromage, le lait, le blanc d'oeuf, la banane, le boeuf, la farine, le vin et la bière sont également des sources d'isoquinolines^(31;32). Par ailleurs, les concentrations d'isoquinolines que l'on retrouve dans ces aliments sont très basses comparativement aux quantités nécessaires pour induire le parkinsonisme dans certains modèles animaux⁽³²⁾. Cependant, l'accumulation graduelle de ces produits dans le cerveau est en accord avec la progression lente de la maladie de Parkinson. De plus en plus d'études démontrent que les tétrahydroisoquinolines (TIQ) exercent des effets neurotoxiques similaires à ceux de MPP⁺ (Figure 11b). Les TIQs empêchent la synthèse de la dopamine en inhibant l'enzyme tyrosine

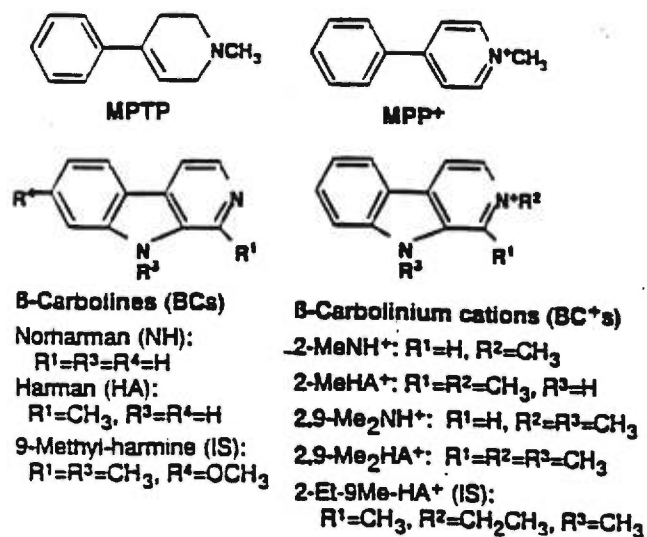


Figure 11a: β -carbolines et MPTP/MPP⁺
(Matsubara et coll., 1995)

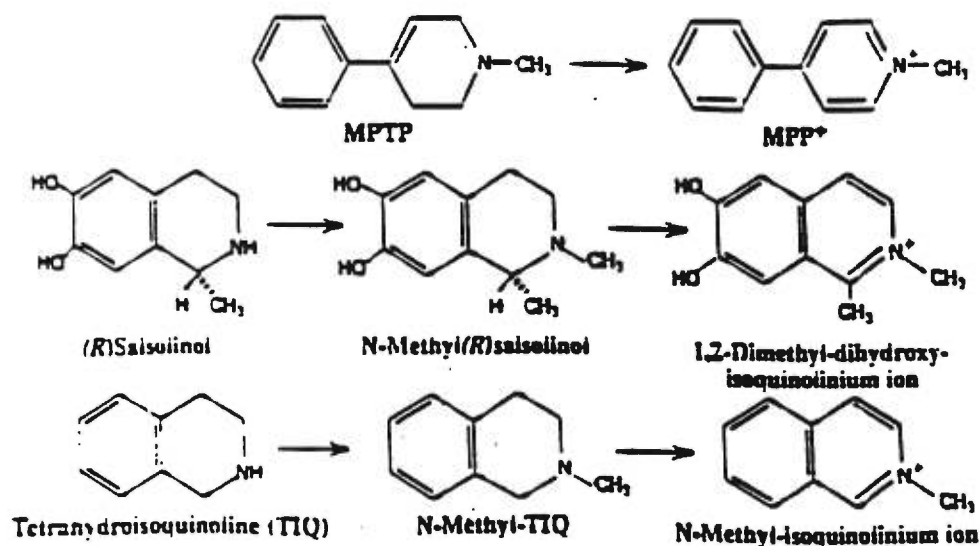


Figure 11b: L'activation du MPTP et des TIQs en MPP⁺ et analogues
(Naoi et coll., 1995)

hydroxylase⁽⁹⁾. Cette enzyme joue un rôle essentiel au niveau de la biosynthèse des catécholamines comme la dopamine. Il faut noter que la toxicité des TIQs dans la substance noire est moins dommageable que celle induite par MPTP⁽⁹⁾.

Les TIQs pourraient être synthétisées de façon endogène. Le salsolinol est une TIQ synthétisée à partir de la condensation de la dopamine et de l'acétaldéhyde ou de la dopamine et du pyruvate. Lorsque ce dernier est impliqué, la condensation est suivie d'une décarboxylation enzymatique et d'une réduction⁽³³⁾. Des études *in vivo* chez le rat ont démontré que l'activité de N-méthylation de salsolinol est plus élevée dans la substance noire comparativement à d'autres régions du cerveau. Ces résultats indiquent donc que le N-méthyl-salsolinol est synthétisé, de façon prédominante, dans ou près des neurones dopaminergiques⁽³⁴⁾. De plus, le méthyl-salsolinol est véhiculé par les transporteurs dopaminergiques, ce qui pourrait expliquer la vulnérabilité de la voie nigro-striée au TIQ. Le méthyl-salsolinol est ensuite oxydé en 1,2-diméthyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium (DiMeDHIQ⁺). Cette molécule a une structure semblable à celle de MPP⁺ (Figure 11b), qui est confirmé par son action inhibitrice au niveau de la chaîne respiratoire⁽³⁴⁾ et elle provoque une augmentation de la production des radicaux libres. *In vitro*, le N-méthyl-(R)-salsolinol induit un dommage à l'ADN ainsi que des changements de nature apoptotique dans les neuroblastomes dopaminergiques humains⁽³³⁾. Naoi et coll. ont démontré que la concentration de N-méthyl-(R)-salsolinol est augmentée dans le liquide céphalo-rachidien des gens atteints de la maladie de Parkinson⁽³⁵⁾. Ils ont également caractérisé une enzyme isolée du cerveau humain qui synthétise le (R)-salsolinol⁽³⁶⁾. Le N-méthyl-(R)-salsolinol et son produit d'oxydation, le DiMeDHIQ⁺ s'accumulent dans la voie nigro-striée des cerveaux humains⁽³⁷⁾. Ces

TIQs pourraient donc agir sur les neurones dopaminergiques de façon à induire une dégénérescence neuronale caractéristique de la maladie de Parkinson.

2.5 Stress oxydatif, radicaux libres et théorie mitochondriale

Une hypothèse particulièrement intéressante de la pathogénèse de la maladie de Parkinson est celle reliée à la formation excessive d'espèces réactives oxygénées (EROs) et l'induction du stress oxydatif⁽¹²⁾ par l'épuisement des mécanismes naturels de défense antioxydants de l'organisme⁽³⁸⁾.

Comme il a été décrit précédemment, la neurotoxine MPP⁺ agit de façon sélective sur les neurones dopaminergiques et s'avère être un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes impliqués dans le parkinsonisme. En fait, lorsque le MPP⁺ se retrouve à l'intérieur du neurone dopaminergique, il est acheminé dans la mitochondrie par un mécanisme de pompe dont le moteur est le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane mitochondriale⁽²²⁾. A l'intérieur de la mitochondrie, le MPP⁺ inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. C'est ainsi qu'il y a interruption de la phosphorylation oxydative, diminution rapide de la production d'adénosine triphosphate (ATP) et accumulation de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et de lactate dans la cellule^(39;40). La crise énergétique due à la diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et à la perte du complexe α -cétoglutarate déshydrogénase de la substance noire chez les parkinsoniens pourrait être un mécanisme relativement important quant à la mort des neurones dopaminergiques⁽⁴¹⁾(Figure 12). Le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase possède deux fonctions primordiales : il fournit le NADH pour la chaîne respiratoire et il exerce

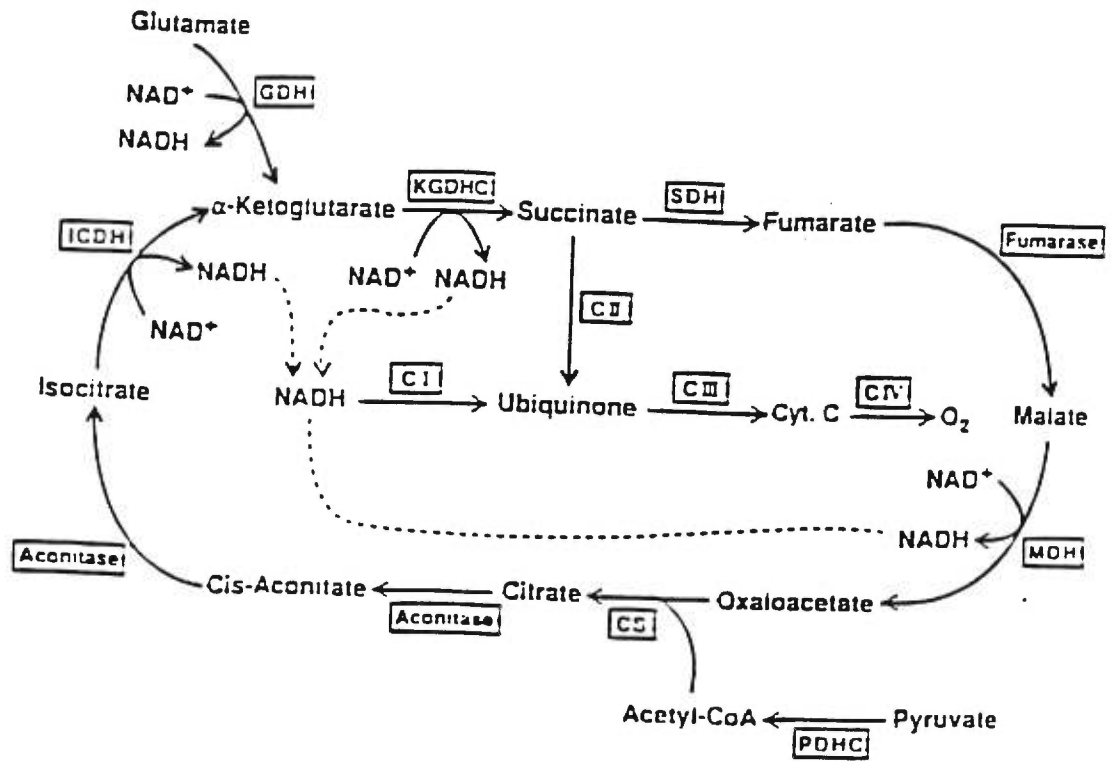


Figure 12: Fonction du complexe α -cétoglutarate dans la chaîne respiratoire (Mizuno et coll., 1995)

une fonction enzymatique très importante en approvisionnant le cycle de l'acide citrique en succinate⁽⁴⁰⁾. Ce dernier, en plus de son rôle dans le cycle de Krebs, est un substrat essentiel lors des transferts d'électrons dans la chaîne respiratoire⁽⁴¹⁾.

L'inhibition de la chaîne respiratoire par le biais de l'interruption de la phosphorylation oxydative pourrait entraîner une dépolarisation neuronale et une excitotoxicité secondaire. Cette dernière a pour conséquence un influx de calcium à l'intérieur du neurone, qui s'accumule dans la mitochondrie et mène indirectement à la production de molécules très instables et cytotoxiques, les radicaux libres. L'action destructrice de MPP^+ est donc amplifiée par la formation des radicaux libres⁽²⁶⁾. Le stress oxydatif serait donc un phénomène secondaire à la détresse respiratoire puisque celle-ci augmente la formation des radicaux libres⁽⁴¹⁾.

On note ainsi une double action de MPP^+ au niveau de la neurotoxicité : inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire ainsi qu'une production directe de radicaux libres par l'oxydation de la dopamine libérée; les deux voies menant à la formation de radicaux libres⁽²⁶⁾ (Figure 8). Ceux-ci, afin de stabiliser leur propre structure, déplacent des électrons des atomes voisins. Les radicaux libres peuvent ainsi causer des dommages irréversibles aux cellules de l'organisme. La séquence de formation des radicaux libres dans une cellule saine est décrite à la figure 13⁽³⁹⁾. Les principaux radicaux libres formés sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ce dernier est le plus réactif des deux malgré la capacité de l'anion superoxyde d'inactiver l'enzyme NADH déshydrogénase du complexe I de la chaîne respiratoire⁽³⁹⁾. Les radicaux libres, en plus d'être une cause très importante de stress oxydatif dans l'organisme, s'attaquent aux

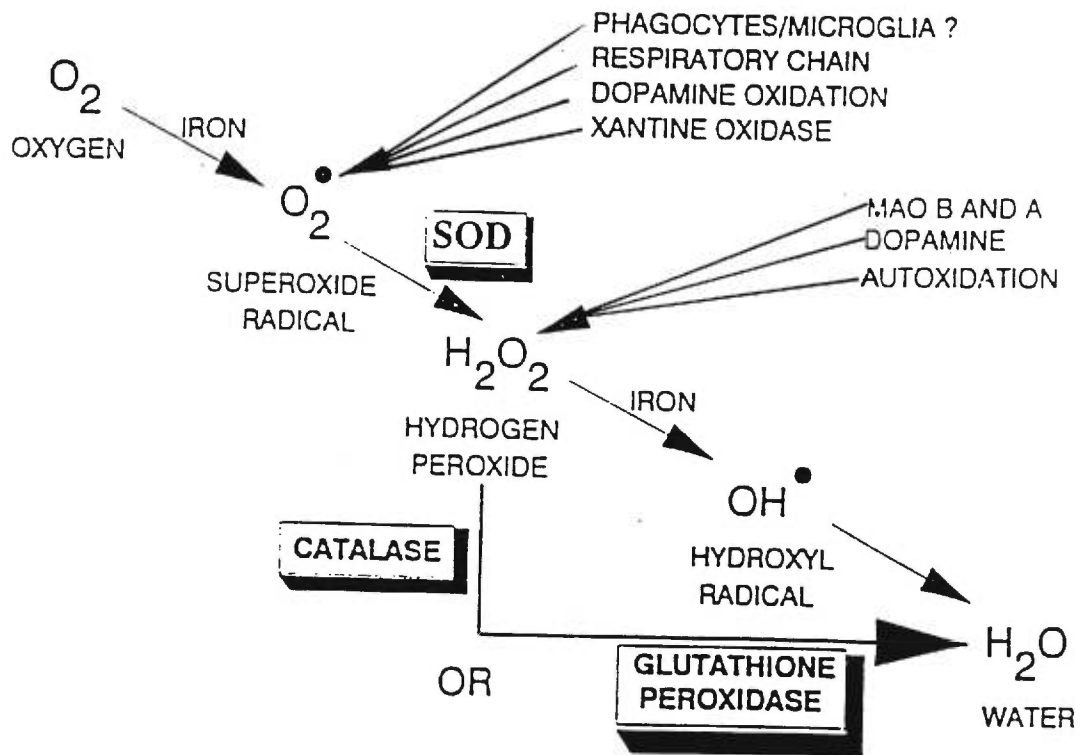


Figure 13: Séquence de formation des radicaux libres
(Poirier et coll., 1993)

membranes lipidiques. La peroxydation lipidique ainsi produite a pour conséquence une perte progressive de la fluidité membranaire, une réduction du potentiel membranaire et une augmentation de la perméabilité à certains ions, notamment le calcium⁽⁴²⁾. On note ainsi qu'il existe un cercle vicieux puisque le calcium entraînera à son tour la formation de radicaux libres, comme il a été décrit précédemment (Figure 6).

Il faut noter que certains métaux de transition comme le fer et le cuivre sont également impliqués dans la formation des radicaux libres^(5;43). En effet, les réactions d'oxydation sont catalysées par ces métaux de transition. Lorsque la concentration de fer dans l'organisme s'élève, il y a augmentation du risque de synthèse de radicaux libres. Des études ont démontré que le cerveau des parkinsoniens contient plus de fer que des cerveaux « normaux »^(38;44). D'autres études ont également démontré que le stress oxydatif peut lui-même fournir le fer nécessaire pour la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) et ainsi entraîner un dommage moléculaire⁽³⁸⁾. Cependant, le fer ferrique (Fe^{3+}) de l'organisme n'est pas disponible pour la réaction de Fenton tant qu'il n'est pas transformé en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier, nécessaire à la réaction décrite plus haut, est formé par l'intermédiaire d'une réaction de Fenton superoxyde-dépendante : $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$.

Le stress oxydatif s'avère être un mécanisme relativement complexe qui met en relation une multitude de molécules susceptibles d'être impliquées directement ou indirectement dans la maladie de Parkinson. L'hypothèse du stress oxydatif fait le lien entre la plupart des hypothèses étiologiques discutées dans ce mémoire. En effet, le vieillissement est associé à une diminution de l'état antioxydant de l'organisme, ce qui rend ce dernier plus vulnérable à l'attaque

oxydative⁽²¹⁾. L'environnement, quant à lui, est une source non négligeable de molécules et de composés susceptibles d'engendrer un stress oxydatif (ex. : pesticides, toxines exogènes)⁽⁶⁾. Le cerveau lui-même est capable de synthétiser les neurotoxines endogènes. Finalement, la majorité des toxines discutées dans ce mémoire entraînent des réactions oxydatives.

2.5.1 Controverse de l'hypothèse du stress oxydatif

Malgré tous les arguments en faveur de l'hypothèse du stress oxydatif, il existe des mentions dans la littérature qui réfutent en partie cette éventualité. Certaines observations cliniques et d'autres plus techniques sont à l'origine d'une telle controverse⁽⁴⁵⁾. Il faut cependant noter que tous les arguments énumérés ci-bas proviennent du même groupe de scientifiques:

- absence d'un effet délétère de la Levodopa (précurseur de la DA utilisé pour traiter les parkinsoniens)
- absence d'un impact frappant de Deprenyl (inhibiteur de la MAO-B) sur la progression de la maladie
- absence de parkinsonisme chez les gens présentant une déficience en vitamine E (antioxydant)
- absence de parkinsonisme suite à l'irradiation intracrânienne qui induit la production des radicaux libres
- absence de corrélation entre le taux de renouvellement de la dopamine et celui de la mort des cellules dopaminergiques
- absence d'explication du rôle des radicaux libres pour d'autres désordres neurodégénératifs qui partagent des aspects pathologiques avec la maladie de Parkinson (argument qui constituait vraiment une controverse il y a quelques années, mais de plus en plus d'évidences

démontrent un lien entre les radicaux libres et d'autres maladies neurodégénératives⁽⁴⁶⁾).

En effet, plusieurs éléments pourraient être associés à la pathogénèse de la maladie de Parkinson, dont certains mécanismes sous-jacents au dommage mitochondrial et au stress oxydatif⁽²¹⁾. Cependant, l'échec associé à l'arrêt de la maladie en progression ne démontre pas nécessairement que le stress oxydatif n'est pas une cause importante des événements surtout précoces qui engendrent le parkinsonisme⁽⁴⁵⁾. En fait, la perte de 80% des neurones dopaminergiques lors du diagnostic de la maladie de Parkinson pourrait être un facteur trop important pour la réussite d'une intervention antioxydante.

I. 3. Apoptose et nécrose

L'apoptose est un phénomène soupçonné de jouer un rôle dans le processus de mort cellulaire caractéristique du parkinsonisme et peut être associé à la plupart des hypothèses discutées ci-haut. Il est tout d'abord important de faire la distinction entre la mort cellulaire par apoptose et celle par nécrose. Les principales différences entre la nécrose et l'apoptose sont décrites au tableau 1⁽²⁵⁾. La nécrose est une mort cellulaire qui est caractérisée au niveau morphologique par une dégénérescence initiale des structures cytoplasmiques et des membranes plasmiques suivie par la perte de l'intégrité nucléaire. La nécrose est en fait une forme passive de mort cellulaire « accidentelle » qui fait suite à un dommage physique⁽²¹⁾. Le stress oxydatif est associé autant à la nécrose qu'à l'apoptose. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la peroxydation lipidique entraîne une destruction membranaire caractéristique de la nécrose. D'autre part, des études *in vitro* avec des neurones corticaux ont démontré que le dommage

Tableau 1 : Caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose
(traduction de Gerlach et coll., 1996)

	Apoptose		Nécrose
ADN	Fragmentation inter-nucléosomale hâtive	Digestion tardive de l'ADN au hasard	
Noyau	Condensation hâtive de la chromatine Destruction nucléaire hâtive	« Pyknose » hâtive Dégénérescence nucléaire tardive	
Intégrité membranaire	Persiste tardivement	Anormale hâtivement	
Mitochondrie	Apparaît normale	Gonflement	
Inflammation	Non	Oui	

oxydatif exercé sur les molécules d'ADN peut servir d'élément déclencheur pour l'apoptose^(21;42).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus actif de déplétion cellulaire génétiquement contrôlé et comportant une réaction en chaîne hautement spécifique⁽⁴⁷⁾. L'apoptose est donc un mécanisme complexe qui permet à l'organisme d'autodétruire des cellules lorsqu'elles deviennent superflues ou désordonnées⁽⁴⁸⁾. On sait que l'apoptose joue un rôle physiologique majeur lors de l'organisation et du développement du système nerveux. L'importance du processus de mort cellulaire dans les maladies neurologiques apparaît donc ici. L'hypothèse principale reliant l'apoptose à la maladie de Parkinson stipule que la dopamine, neurotransmetteur principal des neurones de la voie nigro-striée et pouvant être toxique sous certaines conditions (renouvellement accru, autoxydation), serait capable d'induire un processus de mort cellulaire caractéristique de l'apoptose. La dopamine induit la mort neuronale *in vitro* et activerait l'apoptose de façon inappropriée⁽⁴⁷⁾. Le mécanisme de l'induction de l'apoptose par la DA n'est pas encore élucidé. La formation des EROs serait probablement impliquée. Des études ont également démontré que les EROs exercent une régulation de l'activité des facteurs de transcription. En effet, un facteur de transcription répondant à l'action du stress oxydatif connu sous le nom de « facteur nucléaire κ B » (NF- κ B) peut être activé par le peroxyde d'hydrogène et par les EROs. De plus, la plupart des stimuli capables d'activer NF- κ B peuvent être bloqués par des antioxydants⁽⁴⁹⁾.

Une multitude de protéines seraient impliquées dans l'apoptose chez l'humain. Le proto-oncogène *bcl-2* serait un inhibiteur de l'apoptose⁽⁵⁰⁾. Deux espèces d'ARN messager codant pour le *bcl-2* ont été identifiées dans le cerveau humain⁽⁵⁰⁾. Chez les personnes atteintes de la maladie

de Parkinson, la quantification des ARN messager *bcl-2* dans la substance noire démontre que leur expression n'est pas altérée par rapport à des personnes témoins, ce qui accroît la possibilité que l'expression d'autres composantes de l'apoptose soit mise en cause⁽⁵⁰⁾. D'autres chercheurs ont d'ailleurs identifié une molécule protéolytique, l'apopainé, qui agirait en tant que médiatrice de l'apoptose chez l'humain mais dont le rôle exact demeure obscur⁽⁵¹⁾.

En résumé, l'apoptose contribue probablement à la mort cellulaire dans la maladie de Parkinson. La cause exacte de cette mort cellulaire programmée n'est pas élucidée. Cependant, les radicaux libres, les niveaux insuffisants de facteurs de croissance (BDNF par exemple⁽⁵²⁾) ainsi que les niveaux excessifs de neurotransmetteurs feraient parties de l'explication du phénomène⁽⁴⁸⁾. Le fait que l'apoptose soit impliquée dans le processus de dégénérescence neuronale relié à la maladie de Parkinson permet de croire en la possibilité de moduler cette mort cellulaire programmée afin de ralentir ou de bloquer la progression de la maladie.

I. 4. État actuel des connaissances par rapport à la maladie de Parkinson

4.1 Sensibilité du système nerveux au stress oxydatif

Le cerveau est particulièrement vulnérable aux mécanismes radicalaires pour plusieurs raisons^(11;38) :

- la consommation élevée d'oxygène du cerveau (35 ml/min.kg comparativement à 44, 59 et 96 ml/min.kg pour le foie, le coeur et les reins respectivement)
- l'activité de la catalase, une enzyme antioxydante, est basse dans le cerveau

- le cerveau possède des quantités modérées des enzymes superoxyde dismutase et glutathion peroxydase, enzymes possédant un rôle antioxydant
- le statut antioxydant du système nerveux est plus bas que la plupart des autres organes
- les membranes cellulaires sont riches en acides gras polyinsaturés, ce qui augmente le risque de peroxydation à cause des doubles liens
- certaines régions du cerveau, dont la substance noire, sont riches en fer et en ascorbate, substances qui catalysent des réactions responsables de la production de radicaux libres
- la présence d'acides aminés excitatoires et de neurotransmetteurs dont le métabolisme entraîne la production d'EROs
- le cytochrome P450 et l'activité de la MAO de la membrane mitochondriale externe sont d'autres sources d'espèces réactives oxygénées qui proviennent du métabolisme du cerveau
- la régénération des neurones est pratiquement absente.

4.2 La peroxydation lipidique

Les lipides des membranes cellulaires sont l'une des plus importantes cibles d'attaque par les radicaux libres dans les cellules humaines. En effet, ces dernières contiennent de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés (AGPI) dans leurs phospholipides. Les AGPIs contiennent deux doubles liaisons ou plus à l'intérieur de leur structure. Plus le nombre de double liens est grand, plus le déplacement des électrons est facile. Ceci les rend extrêmement vulnérables à l'attaque oxydative par les radicaux libres (Figure 5)⁽²⁰⁾. Le radical hydroxyle produit par radiation ionique ou par d'autres processus attaque les AGPIs plus rapidement que les acides gras monoinsaturés ou saturés. Le mélange des ions fer et cuivre avec l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) initie également la peroxydation lipidique. L'interaction des radicaux libres et des AGPIs mène à la production d'un radical lipidique avec des doubles liens allylique, ce qui peut réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire afin de produire un radical peroxyte⁽²⁰⁾. Ce dernier attaque une autre molécule lipidique en enlevant l'hydrogène ce qui produit un hydroperoxyde lipidique et un autre radical lipidique (L^*). Ce radical lipidique initie la séquence de propagation de nouveau. Les radicaux peroxytes, lorsque générés dans les membranes, peuvent réagir avec les résidus d'acides aminés sur les protéines membranaires, ce qui altère leur fonction. En terminant, un simple événement déclencheur peut entraîner la conversion de centaines de molécules d'acides gras en peroxydes lipidiques, ce qui altère l'intégrité structurale et les fonctions physiologiques des membranes cellulaires⁽²⁰⁾.

4.3 Protection du cerveau contre le stress oxydatif

Le système nerveux possède quatre niveaux de défense contre le stress oxydatif :

- défense enzymatique
- protéines
- antioxydants liposolubles
- antioxydants hydrosolubles

4.3.1 Défense enzymatique

Les principales enzymes responsables de la défense antioxydante du cerveau sont les suivantes et elles sont illustrées à la figure 14⁽⁵³⁾:

- a) superoxyde dismutase (SOD)
- b) catalase
- c) glutathion peroxydase

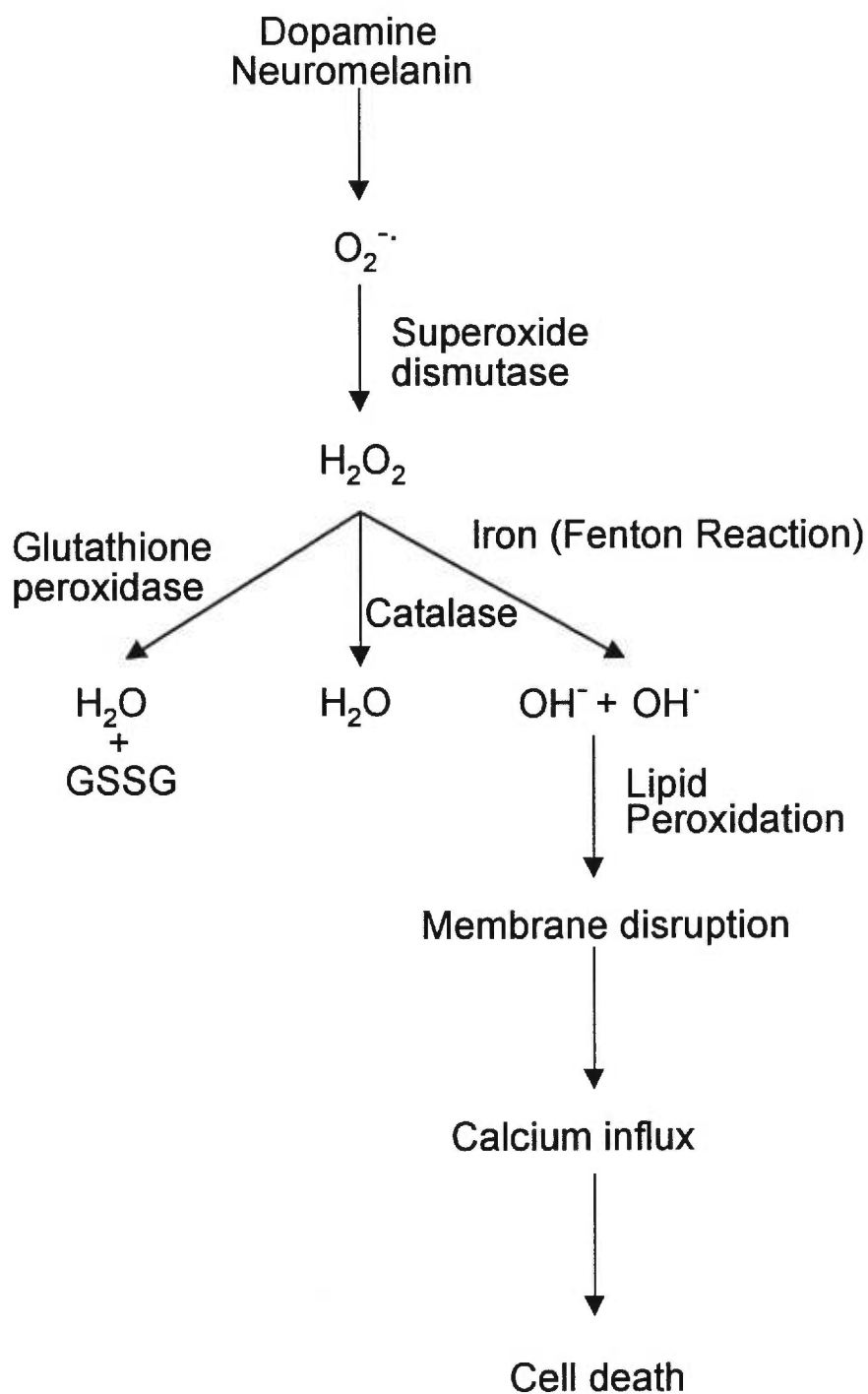
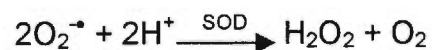


Figure 14: Enzymes impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme (Hirsch, 1992)

a) Superoxyde dismutase

Le cytoplasme, la mitochondrie des cellules humaines ainsi que les vaisseaux sanguins contiennent l'enzyme superoxyde dismutase qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ce dernier étant relativement moins toxique que l'anion superoxyde, selon la réaction suivante⁽²⁰⁾ :



La SOD existe en trois isoformes : la forme cytosolique contient un équivalent de Cu²⁺ et de Zn²⁺ (Cu/Zn SOD), l'enzyme mitochondriale contient le Mn²⁺ (Mn SOD)⁽⁴⁰⁾ et l'enzyme extracellulaire peut contenir soit le Cu²⁺ et le Zn²⁺ ou soit le Mn²⁺⁽⁵⁴⁾. Plusieurs études tentant de démontrer l'activité de l'enzyme SOD chez les gens atteints de la maladie de Parkinson ont été effectuées : il existe une certaine controverse à ce sujet. En effet, quelques études révèlent une activité diminuée de la SOD tandis que d'autres démontrent une augmentation de l'activité de la SOD dans le cerveau de gens atteints de parkinsonisme^(55;56). Il est difficile d'établir quel serait l'effet le plus néfaste entre une diminution ou une augmentation de la concentration de SOD dans l'organisme. En effet, une diminution entraînerait une augmentation de la concentration de l'anion superoxyde, ce qui s'avèrerait très néfaste pour l'organisme. Une augmentation de SOD, quant à elle, entraînerait la surproduction de peroxyde d'hydrogène, composé non toxique en soi, mais susceptible de réagir avec le fer afin de former le radical hydroxyle.

b) Catalase

La catalase, enzyme qui contient du fer et qui se retrouve dans les peroxysomes, catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène

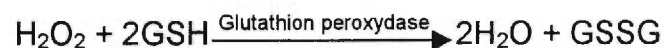
(H₂O₂), produit par la dismutation de l'anion O₂^{•-} (ou d'autres réactions comme l'oxydation de la DA). Les produits finaux de cette réaction sont l'oxygène et l'eau :



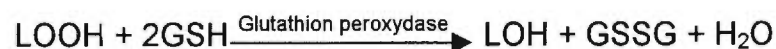
Une controverse existe également au sujet de la catalase : certaines études démontrent une activité diminuée de cette enzyme tandis que d'autres prouvent une activité inchangée de la catalase chez les parkinsoniens^(55;56). Une diminution de l'activité de la catalase pourrait devenir éventuellement toxique puisqu'il y aurait accumulation de peroxyde d'hydrogène.

c) Glutathion et glutathion peroxydase (GSHpx)

Le glutathion est un tripeptide composé de L-glutamate, de L-cystéine et de glycine. Le glutathion est un piègeur de radicaux libres qui est très efficace contre le radical hydroxyle⁽²¹⁾. L'enzyme cytoplasmique glutathion peroxydase contient du selenium et réduit aussi le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en catalysant sa réaction avec le glutathion réduit (GSH) afin de former le glutathion disulfide oxydé (GSSG) et l'eau :



De plus, l'enzyme glutathion peroxydase peut, en présence de glutathion, réduire les acides gras libres hydroperoxydes (LOOH) en acides hydroxyles (LOH), produits moins toxiques:



Des études immunocytochimiques ont démontré la localisation de l'enzyme GSHpx dans diverses régions du cerveau de la souris. Les neurones dopaminergiques de la substance noire expriment des niveaux abaissés de l'antigène GSHpx par rapport à ceux du tegmentum ventral⁽⁵⁷⁾. Ce dernier est une région du cerveau riche en cellules catécholaminergiques. Ces résultats suggèrent une sensibilité de la substance noire à un dommage oxydatif issu de l'oxydation des catécholamines, des neurotoxines ou de l'excitotoxicité.

Chez l'humain, les niveaux de GSH sanguin déclinent avec l'âge. Cette diminution peut être une cause sous-jacente au vieillissement, mais surtout à l'apparition d'une variété de maladies, dont le parkinsonisme⁽²¹⁾. Des études ont également révélé des niveaux abaissés de GSH sanguin chez les parkinsoniens⁽²¹⁾.

4.3.2 Protéines

Certaines protéines agissent en liant les métaux susceptibles de participer à une réaction où le produit final serait un radical libre ou une espèce réactive oxygénée. En fait, ces protéines séquestrent les métaux de transition. Il en existe plusieurs notamment, la métallothionéine, l'albumine et la lactoferrine. Il y a aussi la ferritine (réserve intracellulaire de fer de l'organisme) et la transferrine (molécule de transport du fer) qui lient le fer et la céruloplasmine qui lie le cuivre, inhibant ainsi les peroxydations qui dépendent de ces métaux⁽⁴⁰⁾. La ferritine est en fait une molécule de mise en réserve du fer dans l'organisme⁽³⁸⁾.

4.3.3 Antioxydants liposolubles

Ces molécules liposolubles sont : a) tocophérols (vitamine E)
b) caroténoïdes

c) ubiquinone

d) acide α -lipoïque

a) tocophérols (vitamine E)

La vitamine E s'intègre dans la membrane lipidique, capte les radicaux peroxydes et les empêche d'attaquer les protéines ou les acides gras polyinsaturés. Le radical vitamine E (tocophéryl) résultant peut soit être oxydé en réagissant avec un second radical lipidique ou soit être réduit à nouveau en vitamine E via un processus de réparation vitamine C-dépendant (Figure 15)⁽²⁰⁾. Ainsi, la vitamine C et la vitamine E peuvent coopérer de manière à minimiser le taux de peroxydation lipidique⁽⁵⁸⁾. Des études ont démontré que la vitamine E protège les systèmes antioxydants GSH et SOD contre les effets toxiques de la 6-hydroxydopamine, ce qui suggère un effet protecteur dans la maladie de Parkinson⁽⁵⁹⁾.

b) caroténoïdes

La β -carotène et la vitamine E peuvent protéger les membranes plasmiques de façon complémentaire en fournissant un écran de défense autant à des basses (β -carotène) qu'à des hautes (vitamine E) concentrations d'oxygène. De plus, ces deux vitamines peuvent détruire l'oxygène singulet, un autre ERO^(20;60).

c) ubiquinone

L'ubiquinone ou coenzyme Q (CoQ) est un transporteur de la chaîne respiratoire servant à lier les flavoprotéines au cytochrome *b*. Il est un constituant mobile des lipides mitochondriaux et possède une structure semblable à celle des vitamines K et E. La forme prédominante du CoQ chez les animaux, incluant les humains, est le coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)

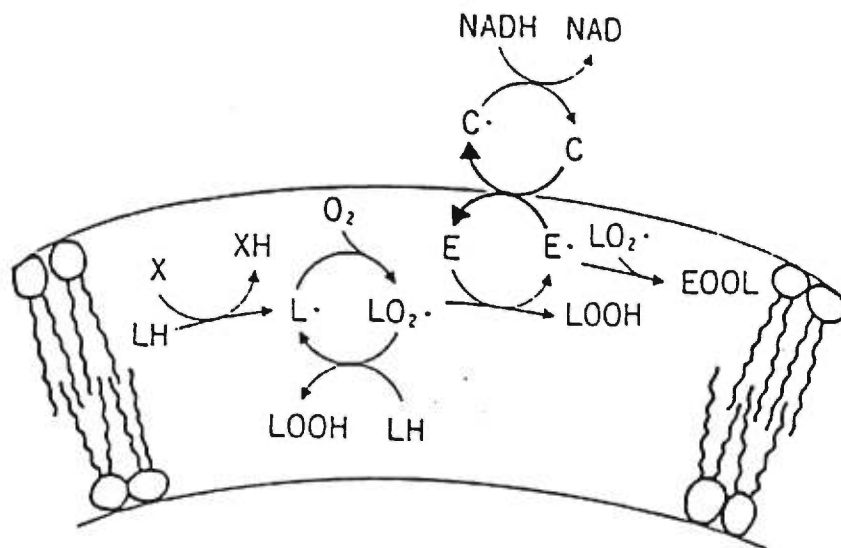


Figure 15: Régénération de la vitamine E par la vitamine C lors de l'oxydation des membranes (Yoshikawa, 1993)

qui contient 10 unités isoprénoïdes dans la partie terminale de la molécule⁽⁶¹⁾. Même si la fonction la plus importante du CoQ est d'agir en tant que composante rédox dans la chaîne respiratoire, il est également un antioxydant puissant. En fait, c'est la forme réduite de la molécule qui agit en tant qu'antioxydant^(40;62). Un déficit en CoQ₁₀ pourrait mener à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire ainsi que des mécanismes de captation des radicaux libres de la mitochondrie. Cette dernière devient plus vulnérable à l'attaque par les radicaux libres et au stress oxydatif. Des études ont révélé que les gens atteints de la maladie de Parkinson possèdent des niveaux plus bas de CoQ dont le CoQ₁₀⁽⁶¹⁾. De plus, les niveaux mitochondriaux de CoQ diminuent avec l'âge : les niveaux de CoQ de jeunes adultes sont de 50% plus élevés que ceux des personnes âgées⁽⁶¹⁾. Une étude pilote récente suggère une tendance vers l'augmentation de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire chez des parkinsoniens recevant une dose orale de CoQ₁₀⁽⁶²⁾. La double fonction du CoQ₁₀ comme constituant de la chaîne respiratoire et comme antioxydant puissant suggère qu'il possède le potentiel afin de ralentir la progression de la maladie de Parkinson^(40;63). De plus, cette double fonction du CoQ₁₀ permet d'entrevoir la possibilité de minimiser celle de MPP⁺ (diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et production directe d'ERO).

d) acide α -lipoïque

L'acide α -lipoïque est une substance de faible poids moléculaire, qui provient en partie de l'alimentation et qui traverse la barrière hémato-encéphalique. L'acide α -lipoïque est capté et réduit en dihydrolipoate par les cellules et les tissus. Il est exporté dans le milieu extracellulaire, ce qui suggère une protection autant dans le milieu intracellulaire qu'extracellulaire. Des études ont démontré qu'autant l'acide α -lipoïque

que le dihydrolipoate sont des antioxydants. Ils participent tous deux à la régénération des vitamines C et E par le cycle rédox et ils élèvent les niveaux intracellulaires de glutathion. Des études cliniques préliminaires suggèrent que l' α -lipoate peut avoir des effets positifs pour le traitement d'une variété de désordres neurodégénératifs, dont le parkinsonisme, en agissant à l'encontre du stress oxydatif (Figure 16)⁽¹¹⁾.

4.3.4 Antioxydants hydrosolubles

L'acide urique et l'ascorbate (vitamine C) dont on a fait mention à la section précédente sont des antioxydants hydrosolubles⁽²⁰⁾. Des études ont révélé que le niveau d'acide urique est diminué chez les gens atteints de la sclérose en plaques, une autre maladie neurodégénérative⁽⁴⁶⁾. La vitamine C, malgré son effet antioxydant, peut devenir pro-oxydante. En effet, des études *in vitro* ont démontré que l'ascorbate peut promouvoir la peroxydation lipidique en réduisant le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}), ce qui catalyse la formation de radicaux libres⁽¹⁵⁾.

4.4 Possibilités de traitement

Il existe plusieurs traitements mais aucun ne peut guérir de façon définitive la maladie de Parkinson. Ces traitements sont :

- 4.4.1 Thérapie de remplacement à la L-DOPA
- 4.4.2 Inhibiteurs de MAO-B
- 4.4.3 Facteurs de croissance et thérapie génique
- 4.4.4 Transplantation
- 4.4.5 Thalamotomie et pallidotomie
- 4.4.6 Antioxydants

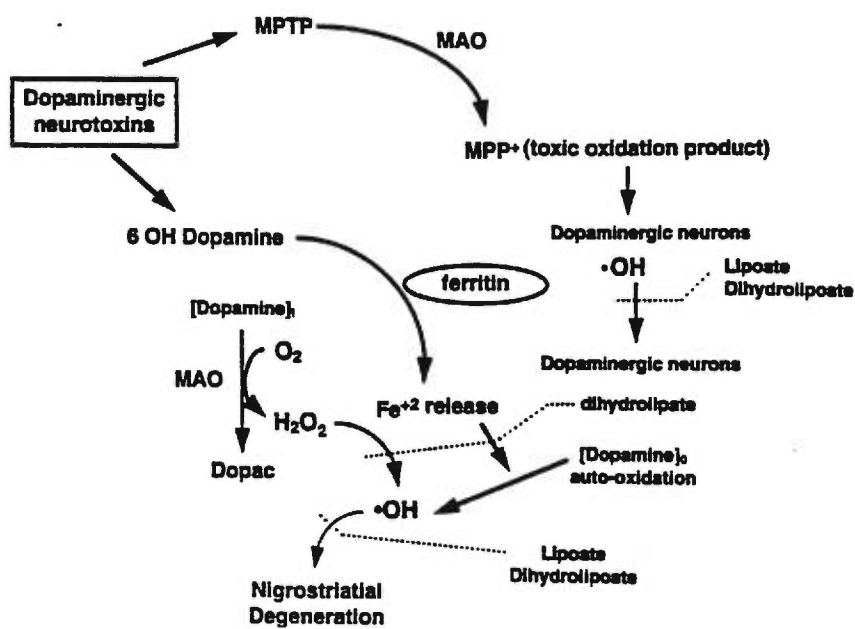


Figure 16: Sites d'action possibles de l' α -lipoate par rapport au stress oxydatif et à la maladie de Parkinson (Packer et coll., 1997)

Le fait que la maladie de Parkinson est probablement la conséquence d'un long processus qui s'installe de façon progressive suggère la possibilité d'un traitement de nature nutritionnelle et/ou pharmacologique.

En effet, cet aspect permet d'intervenir de façon précoce afin de tenter de ralentir ou même d'arrêter le processus de la progression de la maladie.

4.4.1 Thérapie de remplacement à la L-DOPA

Le traitement à la levodopa demeure une alternative importante pour soulager les principaux signes cliniques des parkinsoniens pendant un certain temps sans toutefois guérir la maladie. Cette thérapie de remplacement fonctionne en administrant le précurseur de la dopamine, la L-DOPA afin qu'il y ait synthèse éventuelle de dopamine (Figure 4)⁽¹⁶⁾. Malheureusement, une multitude de complications se développe après quelques années d'utilisation de la L-DOPA. En effet, après cinq ans d'utilisation, 75% des personnes développent soit le phénomène du commutateur soit des dyskinésies gênantes⁽⁶⁴⁾. On ne sait pas encore si les complications motrices associées à l'utilisation chronique de la L-DOPA est due à cette thérapie à long terme ou à la progression « normale » de la maladie⁽⁶⁵⁾. La question préoccupante à l'heure actuelle est de savoir si la thérapie de remplacement augmente le stress oxydatif dans le cerveau, ce qui contribuerait aux complications motrices mais aussi à l'aggravation de la maladie elle-même. La « toxicité » de la L-DOPA pourrait être due au fait qu'elle met plus de dopamine à la disposition des neurones et que, puisque le renouvellement de la dopamine est augmentée durant les stades précoces de la maladie, il y a plus de probabilités que la dopamine subisse l'autoxydation ou la transformation enzymatique et engendre un stress oxydatif en

produisant des radicaux libres. De plus, des études ont démontré que la L-DOPA induit l'apoptose *in vitro* ce qui suggère que la dégénérescence de la voie nigro-striée serait accélérée^(66;67).

4.4.2 Inhibiteurs de MAO-B

Les inhibiteurs de l'enzyme MAO-B pourraient exercer un effet neuroprotecteur en ce qui a trait à la prévention et au ralentissement de la progression de la maladie de Parkinson. Cet effet neuroprotecteur serait relié à la réduction du stress oxydatif suite à la diminution de la production de radicaux libres, attribuable en partie au catabolisme de la dopamine⁽⁶⁸⁾. Un de ces inhibiteurs, qui fut l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années, est le seligiline (*l*-deprenyl) qui est dérivé de l'amphétamine. Le *l*-deprenyl est un inhibiteur sélectif de l'enzyme MAO-B chez les humains. Un mécanisme d'action de seligiline est la prolongation de la durée de la synapse dopaminergique en inhibant la dégradation de la dopamine. De plus, plusieurs études ont démontré que la prise de seligiline par des parkinsoniens à un stade précoce de la maladie retarde le moment du besoin de la L-DOPA⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Le *l*-deprenyl réduit également le phénomène du commutateur associé à l'utilisation chronique de la L-DOPA. Cependant, aucune étude chez l'humain n'a pu démontrer un effet neuroprotecteur quelconque du *l*-deprenyl, ce qui rend cette thérapie de la maladie de Parkinson optionnelle^(65;68).

4.4.3 Facteurs de croissance et thérapie génique

Une approche de thérapie protectrice intéressante mais qui est au stade des études chez l'animal est l'utilisation de facteurs de croissance qui nourrissent et sauvegardent les neurones dopaminergiques. Deux de ces facteurs de croissance présentent un intérêt particulier pour le

parkinsonisme : le « Brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) et le « Glial-cell-line-derived neurotrophic factor » (GDNF). *In vitro*, le GDNF stimule la récupération des neurones dopaminergiques suite à un dommage infligé par le MPP⁺(72). De plus, l'administration intracérébrale de GDNF dans la substance noire prévient complètement la mort cellulaire nigrale dans un modèle de parkinsonisme chez le rat(72). Ces facteurs trophiques sont administrés par thérapie génique lors d'études *in vitro* ou *in vivo*. Les études *in vivo* consistent en l'injection intracérébrale directe de matériel génétique en utilisant les vecteurs appropriés(73). Certaines études ont également démontré que l'administration de BDNF jumelée à la transplantation foetale pourrait offrir une alternative de traitement intéressante(74).

4.4.4 Transplantation

Des études cliniques ont démontré que l'implantation de tissus mésencéphaliques embryonnaires dans les cerveaux de parkinsoniens entraîne la survie des neurones dopaminergiques restants. De plus, ces mêmes études ont révélé l'efficacité des greffons dans l'amélioration des signes cliniques de la maladie de Parkinson. Cependant, la récupération de la motricité s'avère être incomplète et varie énormément d'un sujet à l'autre(75). La transplantation demeure une thérapie prometteuse mais très controversée étant donnée l'utilisation de matériel foetal.

4.4.5 Thalamotomie et pallidotomie

Micheal J. Fox, le célèbre acteur canadien atteint de la maladie de Parkinson, a subi une thalamotomie. Cette dernière consiste en l'élimination des cellules responsables du tremblement(76). Cependant, la bradykinésie, l'akynésie et la stabilité posturale ne sont pas améliorées suite à cette chirurgie. La pallidotomie, quant à elle, est

utilisée pour les parkinsoniens dont les symptômes et les complications ne se corrigent pas par les traitements pharmaceutiques. La pallidotomie consiste en l'ablation chirurgicale de la portion interne du *globus pallidus*. Ce dernier, nommé également *pallidum*, est une composante des noyaux gris centraux et fonctionne en étroite association avec la substance noire pour le contrôle du mouvement de l'organisme⁽⁷⁷⁾. Des études ont démontré que l'ablation d'une portion du *pallidum* est un traitement très efficace pour les gens souffrant d'un parkinsonisme avancé; les bénéfices associés à cette chirurgie sont maintenus pendant au moins un an. Il existe un consensus médical au sujet de la pallidotomie pratiquée par un neurochirurgien expérimenté : c'est une procédure sécuritaire et efficace. Cependant, des études prospectives sérieuses sur le sujet devraient être réalisées afin d'évaluer l'impact exact d'une telle chirurgie^(76;78).

4.4.6 Antioxydants

Comme il en a été fait mention dans la section 3.3, plusieurs antioxydants sont susceptibles de protéger le système nerveux contre le stress oxydatif. Cependant, peu d'entre eux ont fait l'objet d'études bien contrôlées. La vitamine E est l'un des antioxydants qui est le plus étudié relativement à la maladie de Parkinson. Certaines de ces études démontrent que la vitamine E pourrait exercer un effet bénéfique quant au ralentissement de la progression de la maladie⁽⁷⁹⁾. Cependant, il existe beaucoup de controverse à savoir si la vitamine E peut arrêter la progression de la maladie de Parkinson ou, à tout le moins, prévenir l'apparition de cette pathologie^(15;70;71;79;80). Une étude majeure connue sous le nom de « Deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism » (DATATOP) a été effectuée à la fin des années '80. Les conclusions de cette étude démontrent le manque d'efficacité des antioxydants quant à la dégénérescence neuronale associée à la maladie

de Parkinson⁽⁶⁷⁾. Ces résultats ont semé le doute relativement à l'hypothèse du stress oxydatif. Cependant, une autre étude, à plus petite échelle, utilisant des doses plus élevées de vitamine E (3200 I.U./jour) a démontré un effet positif quant au ralentissement de la progression du parkinsonisme⁽⁸¹⁾. De plus, l'étude de Rotterdam concernant des personnes âgées a démontré une relation inverse entre la consommation d'aliments riches en vitamine E et le parkinsonisme de type idiopathique, suggérant un effet protecteur⁽⁷⁹⁾.

L'administration de glutathion pourrait servir à ralentir la progression de la maladie de Parkinson. En effet, Sechi et collaborateurs ont démontré que l'injection intraveineuse de glutathion pendant un mois chez des gens atteints de parkinsonisme améliorerait de façon marquée les habiletés motrices⁽⁸²⁾. L'inconvénient de ce traitement est la nécessité d'administrer le glutathion par injection.

Beaucoup d'études rétrospectives et prospectives contrôlées sont nécessaires afin de déterminer le rôle exact de la vitamine E et surtout des autres antioxydants (caroténoïdes, coenzyme Q₁₀, acide α -lipoïque, glutathion) dans la maladie de Parkinson.

I. 5. Description du projet de recherche

Ce projet de maîtrise s'intégrait dans un programme de recherche dont l'objectif à long terme était, dans un premier temps, de contribuer par nos travaux de recherche à renforcer l'hypothèse du stress oxydatif comme cause partielle de la maladie de Parkinson. Ensuite, ce projet visait à évaluer la pertinence d'utiliser les antioxydants comme agents permettant la prévention ou le ralentissement du parkinsonisme.

Avec la découverte de la neurotoxine MPP⁺ dans les années '70, les recherches sur la maladie de Parkinson ont pris de l'ampleur. En effet, le MPP⁺ a été l'une des premières molécules servant à établir un modèle de parkinsonisme. C'est ainsi que les différentes hypothèses étiologiques de la maladie de Parkinson ont vu le jour.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord voulu mettre sur pied un modèle animal (chez le rat) de parkinsonisme impliquant le stress oxydatif. Nous avons donc procédé à des essais de localisation de la substance noire dans le cerveau de rat. Avec l'injection du crésyl violet selon les coordonnées de l'atlas (Paxinos et Watson), nous avons vérifié visuellement l'emplacement de l'injection afin de s'assurer d'être au bon endroit.

Étant donné les nombreuses études effectuées sur le MPP⁺ et puisque celui-ci exerce une action oxydative directe en plus d'inhiber la chaîne respiratoire au complexe I, nous avons décidé d'opter pour cette substance comme premier modèle de parkinsonisme chez le rat. Plusieurs essais ont été menés afin de déterminer la dose entraînant une réduction de la concentration de la dopamine striatale de 50%. Cette dose a été fixée à 100 nmol.

Nous avons ensuite tenté de trouver une deuxième substance capable d'induire un effet toxique au niveau de la substance noire afin d'établir un élément de comparaison avec le MPP⁺. Nous avons choisi le chlorure de fer (FeCl₃) qui n'exerce qu'un effet oxydant. Les résultats démontrèrent une diminution notable de la concentration de la dopamine striatale. Nous avons donc trouvé les deux composés nous servant de modèles de parkinsonisme nécessaires à notre étude : MPP⁺ et FeCl₃.

Le premier objectif de ce projet de recherche de maîtrise est, tout d'abord, de comparer le degré de stress oxydatif induit par l'injection intranigrale unilatérale de ces deux substances susceptibles de provoquer des réactions oxydatives semblables à celles que l'on observe dans la maladie de Parkinson. Le MPP⁺ engendre une forme de parkinsonisme selon deux mécanismes distincts (Figure 8). Ces deux voies aboutissent à la formation de radicaux libres ainsi qu'au stress oxydatif. Le fer est un oxydant qui catalyse, entre autres, la dégradation du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle.

Dans un deuxième temps, le projet de recherche vise à comparer l'efficacité de deux substances antioxydantes dans les modèles définis plus haut. Ces deux antioxydants, la vitamine E (liposoluble) et son analogue hydrosoluble, le Trolox, ont été utilisés contre le stress oxydatif induit par le MPP⁺ et le fer. La DA striatale reflète l'intégrité de la voie nigro-striée : une diminution de la DA striatale indique un dommage à la voie nigro-striée. La mesure du stress oxydatif est effectuée par la quantification de la production du radical hydroxyle (hydroxylation du 4HBZ en 34DHB).

5.1 Modèles expérimentaux

La figure 17 démontre le protocole expérimental du projet de recherche. L'injection des toxines et des antioxydants se fait directement dans la substance noire et/ou dans le striatum de rats mâles Sprague-Dawley endormis. Les rats récupèrent pendant une semaine et une microdialyse intra-striatale bilatérale est pratiquée afin d'évaluer l'étendue du dommage à la voie nigro-striée ainsi que le degré de stress oxydatif et/ou de neuroprotection s'il y a lieu.

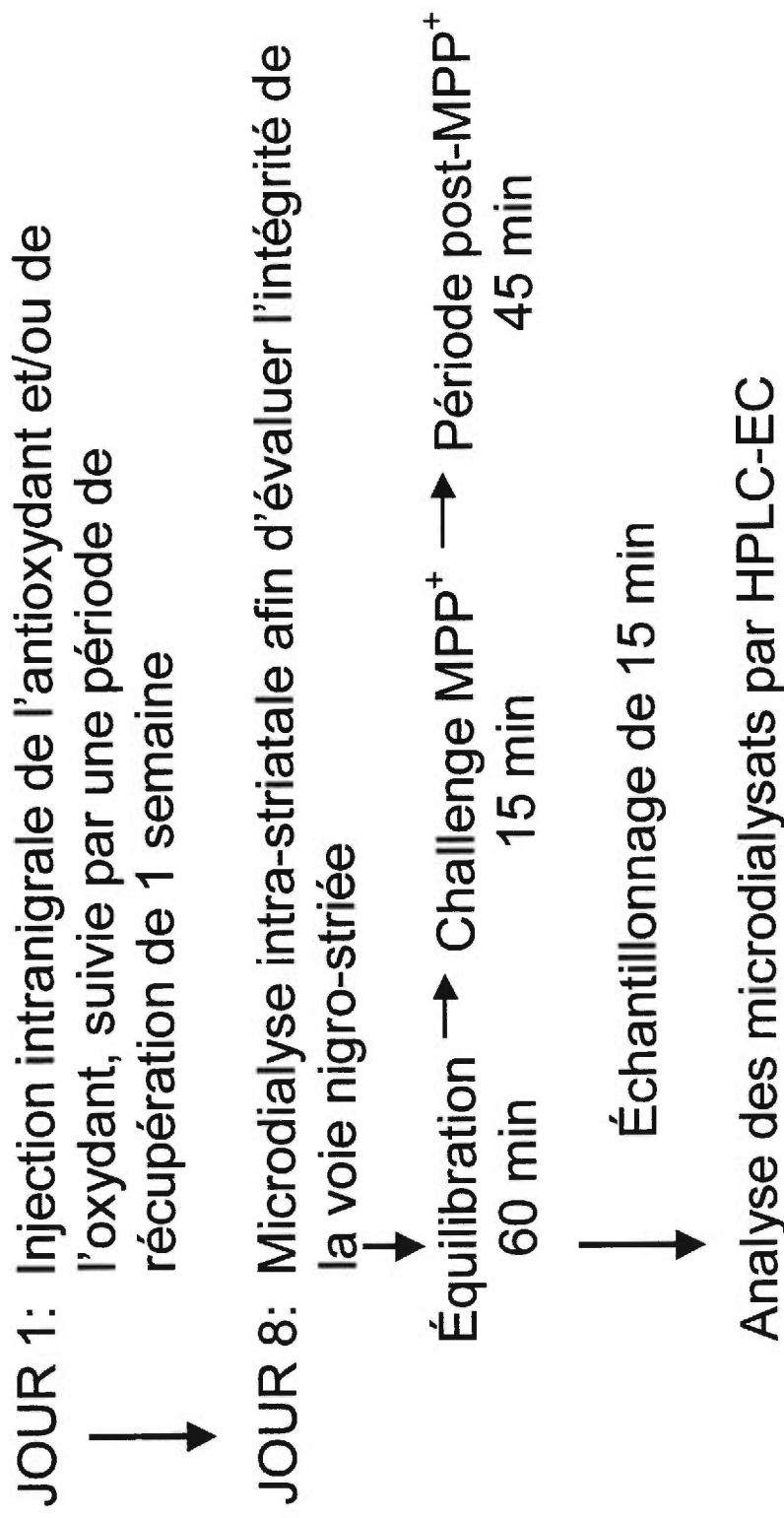


Figure 17: Protocole expérimental

5.2.1 La microdialyse

Cette technique sophistiquée de perfusion *in vivo* permet de mesurer de façon précise et continue le métabolisme des substances libérées dans l'espace interstitiel du cerveau. Les substances diffusent à travers une membrane semi-perméable de dialyse faisant partie d'une sonde (Figure 18) positionnée de façon précise dans le cerveau selon un atlas de coordonnées pour l'espèce en question. La concentration de la substance d'intérêt à la sortie de la sonde reflète la concentration interstitielle. Plusieurs solutions de perfusion peuvent être utilisées à condition que la composition de la solution choisie reflète le plus précisément possible celle du liquide céphalo-rachidien, composition qui diffère du liquide plasmatique. La microdialyse permet aussi l'administration de substance dans des régions précises du cerveau, ce qui peut s'avérer être d'une grande utilité. Par exemple, l'infusion de MPP⁺ permet d'évaluer l'intégrité de la voie nigro-striée en libérant la dopamine. La quantité de dopamine libérée permet de vérifier l'état des neurones dopaminergiques, donc de la voie nigro-striée.^(83;84) Les microdialysats recueillis sont analysés par chromatographie liquide à haute performance avec détection électrochimique (HPLC-EC).

5.3 Analyse par HPLC-EC

Comme il a été mentionné antérieurement les microdialysats sont analysés par HPLC-EC. Cette technologie permet l'analyse simultanée des neurotransmetteurs et des métabolites d'intérêt (notamment la dopamine et le DOPAC) ainsi qu'un indice du stress oxydatif, le 3,4-dihydroxybenzoate produit par l'hydroxylation du 4-hydroxybenzoate, un piègeur du radical hydroxyle^(85;86).

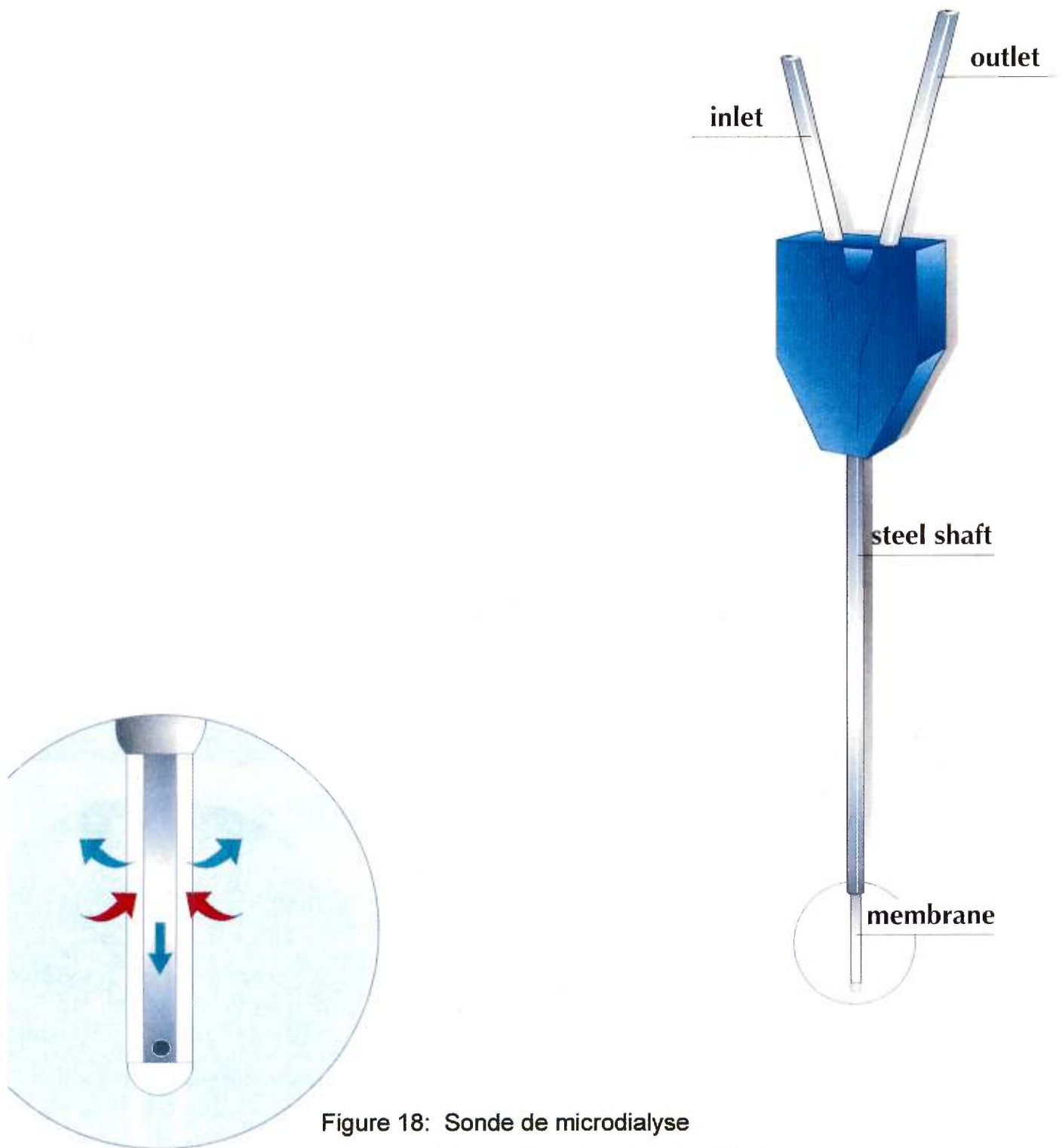


Figure 18: Sonde de microdialyse
(CMA/Microdialysis AB, 1995)

Chapitre deux
PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Co-application of Vitamin E or Trolox Reduces the
Toxicity of Intranigral Injection of 1-Methyl-4-
phenylpyridinium or Iron in Rat Models of Parkinson's
Disease

Chantal Bémeur, Line Ste-Marie, Luc Vachon and Jane A.
Montgomery,
Département de nutrition, Université de Montréal and CHUM
Research Centre, Campus-Notre-Dame

Address correspondence to :

Chantal Bémeur
Laboratoire de neurobiologie, M.8208
CHUM-Campus Notre-Dame
1560 Sherbrooke St. E.,
Montréal, Québec, CANADA

Tel : (514) 281-6000, ext 5606
FAX : (514) 896-4701
Email : chanchan@globetrotter.net

Running Title : Vitamin E or Trolox Reduces MPP⁺ or Iron
Neurotoxicity

ABSTRACT

A free radical hypothesis has been proposed to explain in part the etiology of Idiopathic Parkinson's disease (IPD). Intranigral introduction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) or iron salts has been used to model IPD in the rat. We have compared the damage to the nigro-striatal pathway induced by unilateral intranigral injection of either MPP⁺ or an oxidant, ferric chloride (FeCl₃) in a rat model of IPD. The neuroprotective effects of co-injection of one of two antioxidants, Vitamin E or Trolox (water soluble analog of Vitamin E) were tested in these two models. Following one week recovery, bilateral striatal microdialysis was used to evaluate the integrity of the nigro-striatal pathway. 4-Hydroxybenzoate (4HBZ) injected intraperitoneally at the beginning of the microdialysis experiment was used to trap hydroxyl radicals as 3,4-dihydroxybenzoate (34DHB, hydroxylation product) to estimate free radical production. After 1 hour equilibration, 5 mM MPP⁺ was infused to induce dopamine release as a measure of the integrity of the nigro-striatal pathway. Microdialysate samples were analyzed for dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetate, 4HBZ and 34DHB by HPLC with electrochemical detection. MPP⁺ or FeCl₃ injected into the substantia nigra resulted in decreased dopamine in microdialysis samples collected from the ipsilateral striatum 1 week later, consistent with damage to the nigro-striatal tract. Co-administration of antioxidants with either MPP⁺ or FeCl₃ was somewhat neuroprotective, with Trolox being slightly more effective. In terms of free radical production, the group that received intranigral MPP⁺ tended towards higher 34DHB/4HBZ under basal microdialysis conditions and following an MPP⁺ challenge during microdialysis. A similar MPP⁺ challenge had no effect on the group pretreated with iron. Pretreatment with antioxidants abolished increases in the 34DHB/4HBZ ratio following MPP⁺ infusion. In conclusion, only

intranigral injection of MPP⁺ resulted in chronic production of hydroxyl radicals which could be reduced by Trolox or Vitamin E.

Keywords : Vitamin E, Trolox, MPP⁺, Free radicals, Parkinson's Disease, Rat

INTRODUCTION

Idiopathic Parkinson's disease (IPD), a neurodegenerative disorder which affects nearly 1% of the world population, is characterized by progressive dopaminergic neuron loss in the substantia nigra. The latter is a nucleus responsible for dopamine (DA) synthesis which is an essential neurotransmitter for the body's motor skills. Major clinical signs associated with IPD include tremor, rigidity and bradykinesia. Depression and dementia are non-motor symptoms that appear at a relatively advanced stage⁽¹⁾.

The exact cause of IPD remains unknown but the complexity of mechanisms involved leads us to believe that it is multifactorial. A free radical and oxidative stress hypothesis has been proposed to explain the etiology of a number of neurodegenerative diseases including IPD⁽²⁾. Oxidative stress in an organism is the result of an imbalance between free radical production and natural protective antioxidant mechanisms. A number of observations have been made that implicate increased free radical production and oxidative stress in IPD. These include i) increased lipid peroxidation (LPO) in the substantia nigra as measured by lipid hydroperoxides⁽³⁾, ii) increased nigral protein modification by 4-hydroxynonenal (an LPO product)⁽³⁾, iii) decreased nigral glutathione⁽⁴⁻⁶⁾, iv) decreased uric acid in the caudate and substantia nigra of IPD patients⁽⁷⁾, v) an increase in superoxide dismutase (SOD) activity in the substantia nigra⁽¹⁾ and vi) increased iron which is not protein bound in the substantia nigra^(3;5).

The brain is predisposed to oxidative stress due to its relatively high oxygen consumption, low activity of catalase, moderate amount of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSHpx)

which are antioxidant enzymes, and the high content of polyunsaturated fatty acids in cellular membranes^(8;9). As well, neurons have a limited capacity to regenerate, rendering them more susceptible to physical and chemical stresses.

The fact that oxidative stress may be involved in the pathogenesis of IPD suggests the possibility of a nutritional and/or a pharmacological intervention to moderate the process. Given that neurodegeneration associated with IPD and with normal aging appears to take place in a progressive fashion, slowing down or even stopping the neurodegeneration associated with the disease becomes a potential treatment strategy. Epidemiologic studies suggest that a diet rich in antioxidants may be protective against IPD^(10;11).

In order to elucidate the question of oxidative stress and neuroprotection in IPD, this study was designed to answer three questions. First, would MPP⁺ or iron injected into the substantia nigra cause the same extent of damage to the nigro-striatal pathway? Secondly, given similar degrees of damage, would one or both toxins result in increased oxidative stress in the striatum at a later time? Finally, would co-administration of antioxidants (Vitamin E or Trolox) protect against increased damage and/or increased oxidative stress?

We have investigated the effects of intranigral injections in the rat of two toxins, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) and ferric chloride. Co-injection of antioxidants, either vitamin E or Trolox, was used to evaluate their capacities to counteract the oxidative stress induced by MPP⁺ or iron. One week after the intranigral injections, intrastriatal microdialysis was used to evaluate the integrity of the nigro-striatal pathway as estimated by MPP⁺-induced DA release. Increased free radical

production was determined using 4-hydroxybenzoate (4HBZ), a salicylate analogue, to trap hydroxyl radicals as 3,4-dihydroxybenzoate (34DHB)⁽¹²⁾.

These two animal models lend support to the oxidative stress hypothesis as a contributing cause of IPD. Furthermore, this research puts in perspective the possible neuroprotective role of antioxidants for prevention and treatment of IPD, a devastating neurodegenerative disease.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals : 4-Hydroxybenzoate (4HBZ), sodium 3,4-dihydroxybenzoate (34DHB), ethylenediaminetetraacetic acid disodium-calcium salt (EDTA), 3,4-dihydroxybenzylamine, sodium heptanesulfonate, dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Homovanillic acid and 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺) came from Research Biochemicals International, Natick, MA. Chloral hydrate, sodium acetate, potassium chloride, sodium chloride, calcium chloride and perchloric acid were provided by Fisher Scientific, Montréal, Québec. Trolox, citric acid and ferric chloride were obtained from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI. Vitamin E (d-alpha tocopheryl acetate) was produced by C.E. Jamieson and Company Ltd, Toronto, Canada. Sterile 10% dextrose (USP) was obtained from Baxter Corp., Toronto, Canada. HPLC-grade methanol and other solvents were obtained from local suppliers and were used without further purification. Aqueous solutions were prepared using Milli-Q purified water and were filtered through 0.22 micron nylon filters prior to use.

Rat experiments

1) Intranigral injection

All surgical procedures and protocols were approved by the Animal Protection Committee of the CHUM Research Center in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (Charles-River, Canada) weighing 250-340 g and receiving food and water *ad libitum* were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg IP). Intranigral injection of toxins was used to induce damage to the nigro-striatal pathway. Co-injection of antioxidants was evaluated as a mechanism to salvage the nigro-striatal pathway from

oxidative damage. There were 3 main groups of rats treated with either A) saline (controls), B) iron or C) MPP⁺. Each of these groups was subdivided, depending on whether or not they received either of the two antioxidant treatments, for a total of 9 groups.

Group A : Saline (n=6), Vitamin E (n=3) and Trolox (n=4)

Group B : Iron (FeCl₃) (n=4), Vitamin E + iron (n=4) and
Trolox + iron (n=4)

Group C : MPP⁺ (n=4), Vitamin E + MPP⁺ (n=4) and Trolox + MPP⁺
(n=4)

To ensure delivery of an exact dose of vitamin E or Trolox, the antioxidants were injected intranigrally rather than being given systemically as vitamin E crosses the blood-brain barrier with difficulty. An intranigral injection, 3.7 mm from interaural, 2.8 mm from midline and 7.9 mm from the dura⁽¹³⁾, of 100 nmol MPP⁺ or FeCl₃ or in combination with an antioxidant (vitamin E (8.5 μmol in 4 μl total volume) or its water soluble analog, Trolox (100 nmol)) was accomplished using a 27 G needle attached to an infusion pump (Harvard Apparatus 22, Ealing Scientific; St. Laurent, Québec). A lower dose of Trolox was given due to its enhanced antioxidant properties. The substances were infused at a flowrate of 0.2 μl/min for 20 minutes and the needle was held in place for an additional 15 minutes. The rats were injected with an analgesic, buprenorphine (0.05 mg/kg subcutaneously), at the end of the experiment. The animals were then allowed a 1 week recovery period. During this time, they were weighed each day and injected subcutaneously with 10% dextrose if the rat lost weight. The animals who lost more than 20% of their original weight were excluded from the protocol.

2) Intrastratial microdialysis

On day 8, the animals were reanaesthetized and, using a homeothermic blanket controlled by a rectal thermocouple (Harvard Apparatus, South Natick, MA), they were maintained at a stable temperature (36.7 - 37.2°C) throughout the experiment. Microdialysis probes (CMA/12, 4 mm, CSC, Canada) were stereotaxically implanted bilaterally in the striatum, 10 mm from interaural, 2.5 mm from midline and 4 mm from the dura, relative to the stereotaxic maps of Paxinos and Watson⁽¹³⁾. The microdialysate was Ringer's solution, pH 6, consisting of NaCl (147 mM), KCl (4 mM), CaCl₂ (2.3 mM) prepared in distilled deionized water. The microdialysis probes were perfused at 2 µl/min and samples were collected for 15 min at a time. Placement of the needle and the probes was verified by visual examination subsequent to the experiments. 4-HBZ (400 mg/kg IP), an hydroxyl radical trapping agent⁽¹²⁾, was administered at the beginning of the microdialysis experiment. Sixty minutes later, we infused MPP⁺ (5 mM, MPP⁺ challenge) for 15 min followed by a sampling period of 45 minutes to evaluate the integrity of the nigro-striatal tract as determined by DA release. At the end of each experiment, the animal was sacrificed by decapitation and the brain was rapidly removed and stored frozen at -80°C.

Collection of samples and preparation for analysis

An infusion pump, equipped with plastic syringes and FEP tubing was used to minimize artefactual production of hydroxyl radicals⁽¹⁴⁾. The outlet tubing from the probes were inserted into collection vials (maintained at 4°C) containing 30 µl of 0.1 N perchloric acid containing 0.1% EDTA. The internal standard, 3,4-dihydroxybenzylamine, was added and samples were maintained at 4°C prior to same day analysis.

High performance liquid chromatography (HPLC)

Microdialysis samples were analyzed by HPLC (Waters 600MS, Waters, Canada) with coulometric electrochemical detection (Coulchem II model 5100, SPE Canada) essentially as previously described⁽¹²⁾. The column used was a Novapak C₁₈ RP, 2 by 150 mm (Waters, Canada). The mobile phase consisted of citric acid (20 mM), sodium acetate (50 mM), sodium heptanesulfonate (1.875 mM), and EDTA (0.125 mM) with the pH adjusted to 4.05 with glacial acetic acid. Methanol was added to the buffer to a final concentration of 5.6%, and the HPLC was operated under isocratic conditions with a flowrate of 0.3 ml/min. The electrochemical detector potentials were +390 mV for the guard cell, +340 mV for the oxidation cell and -300 mV for the reduction cell. This permitted the simultaneous analysis of 34DHB, DOPAC, 4HBZ and DA. Quantitation was accomplished using linear equations derived from standard curves prepared using 3,4-dihydroxybenzylamine as internal standard.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM. The statistical evaluation was performed using one-way analysis of variance of samples collected after the MPP⁺ challenge (Instat, Jandel). Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Weight : Over the one week recovery period, a number of groups lost weight despite daily glucose injections (Figure 1). This weight loss was more pronounced with the dual treatment group (oxidant plus antioxidant). A surprising observation was that the greatest loss occurred in the group that received intranigral saline plus vitamin E. This may be due to the higher dose of vitamin E given compared to Trolox.

Dopamine : Intrastratial microdialysis was used to evaluate the extent of DA release following an infusion of MPP⁺. Decreased striatal DA has been associated with increased damage⁽¹⁵⁾.

Saline control groups : Intranigral injection of vitamin E or Trolox did not affect the maximal release of DA as shown in panel A of Figure 2, compared with intranigral injection of saline. The average amount per sample at 90 min (the first collection after MPP⁺ infusion) was 10-13 pmol. Ben-Shachar reported no change in striatal DA and DOPAC concentrations in rat brain homogenates following an intranigral injection of saline, which is consistent with our results and suggests that it serves as a suitable control group⁽¹⁶⁾.

Iron groups : One week after ferric chloride (100 nmol) intranigral injection, striatal DA concentrations decreased by 40% compared to saline controls, (average post MPP⁺ challenge of 6.3 versus 10.7 pmol in iron and saline group respectively) (Figure 2A and 2B). While the difference between the two groups was not significant ($p=0.08$), there was a trend consistent with damage to the nigro-striatal tract. Ben-Shachar et al. reported a 95% decrease in striatal dopamine three weeks after an intranigral injection of 50 μg (\cong 300 nmol) of iron (FeCl_3)

and no change in striatal dopamine following an intranigral injection of 5 μg (\cong 30 nmol) of iron⁽¹⁶⁾. This is in contrast to Chiueh who administered ferrous citrate (4.2 nmol) and observed a 60% decrease in dopamine levels one week later⁽¹⁷⁾. Gutteridge has also demonstrated that an iron salt injected intranigrally into rats produces parkinsonian type behavior, consistent with the proposal that iron-driven oxidative reactions may play a role in Parkinson's disease⁽⁹⁾.

Co-administration of either vitamin E or Trolox with iron produced a slight neuroprotective effect against iron toxicity as we detected higher striatal DA concentrations in these two groups compared with rats receiving iron only (Figure 2B). These two antioxidants produced the same degree of neuroprotection (average of 9 pmol in the 3 samples post MPP⁺ challenge in the vitamin E + iron and Trolox + iron groups compared to 6.3 pmol in the iron group). Joseph et al. have demonstrated that Trolox inhibits DA release induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) (an oxidant) from striatal slices in rats *in vitro*⁽¹⁸⁾.

MPP⁺ groups: Although MPP⁺ injected into the substantia nigra induced a greater decrease in striatal DA concentration than iron injection (average post MPP⁺ challenge of 4.1 pmol and 6.3 pmol in the MPP⁺ and iron groups respectively), the difference was not significant ($p=0.15$). This suggests a similar degree of damage to the nigro-striatal tract caused by the two agents (Figures 2C and 2B).

We observed a 62% decrease in striatal dopamine after a 100 nmol dose of MPP⁺ compared with the saline control group. Chiueh et al. reported a dose-dependent reduction of dopamine levels in the ipsilateral caudate nucleus after an intranigral injection of MPP⁺. Indeed, 2.1, 4.2, 8.4 and 16.8 nmol of MPP⁺ caused a 20.5, 46.8, 69.7

and 84.1% decrease in dopamine levels four days later compared with controls receiving Ringer solution⁽¹⁹⁾. As MPP⁺ is considered to be less toxic in rats than in other species^(20;21), our microdialysis experiment, 8 days after MPP⁺ intranigral injection, may be indicative that the nigro-striatal pathway was recovering from the insult.

Trolox + MPP⁺ intranigral injection resulted in a trend towards higher striatal DA release than the rats treated with MPP⁺ alone ($p=0.07$), suggesting a neuroprotective effect of Trolox (average post MPP⁺ challenge of 6.9 pmol in the Trolox + MPP⁺ group compared to 4.1 pmol in the MPP⁺ group) (Figure 2C). In contrast, vitamin E + MPP⁺ injection had no effect on striatal DA release compared to rats treated with MPP⁺ alone (average post MPP⁺ challenge of 4.1 and 5.6 pmol in the MPP⁺ control group and vitamin E group respectively). Wu et al. reported that infusion of MPP⁺ into the substantia nigra of rats elicited nigral injury that can be inhibited by U-78517F, another vitamin E analog and a potent inhibitor of iron-catalyzed lipid peroxidation.⁽²²⁾

DOPAC

Basal values were variable in all three groups with a tendency to lower values when the animals were pretreated with MPP⁺ (average of 21.0, 15.2 and 10.5 pmol in the equilibration period, i.e. first 60 minutes, in the control, iron and MPP⁺ groups respectively, Figures 3A, 3B and 3C). MPP⁺ challenge during the microdialysis produced a decrease in DOPAC release in all cases, as has been previously observed⁽²³⁾. The post-MPP⁺ decrease in DOPAC mirrored the observed increase in DA release consistent with decreased oxidative metabolism.

34DHB/4HBZ ratio

Hydroxylation of 4HBZ was used as an index of the production of oxidizing species including the hydroxyl radical⁽¹²⁾. This compound traps these species with the advantage of forming only one acidic product, namely 34DHB in contradistinction to salicylate (2-hydroxybenzoate), a more commonly used trapping agent, which produces a mixture of 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoate⁽¹²⁾. Althaus et al. have demonstrated that the systemic administration of salicylate can be used to evaluate hydroxyl radical formation⁽²⁴⁾. As the production of 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoate is proportional to the concentration of salicylate and variations in its concentration are therefore normalized using the ratio of the product to substrate. In the present report, this ratio is the concentration of the hydroxylation product 34DHB to that of 4HBZ, the trapping agent⁽²⁴⁾. Although there were no significant differences between the study groups for the 34DHB/4HBZ ratio, a number of trends were observed which are discussed below.

Saline control group : Prior to the MPP⁺ challenge, the 34DHB/4HBZ ratio was similar (approximately 0.0002) in all 3 control groups (Figure 4A). While the MPP⁺ challenge elicited an equivalent increase in DA release in all 3 groups (Figure 2A), only the saline group exhibited a slight increase in the 34DHB/4HBZ ratio (Figure 4A). Vitamin E or Trolox intranigrally injected tended to decrease the production of 34DHB compared with saline controls (average ratio post MPP⁺ challenge of 0.0002, 0.0004 and 0.0007 in the vitamin E , Trolox and saline control group, respectively, Figure 4A) suggestive of a continuing protective effect in the two antioxidant groups.

Iron group : Pretreatment with iron did not affect basal ratios of 34DHB/4HBZ measured during the first hour of microdialysis (average

of 0.0003) in all 3 iron groups. Considering that the decomposition of hydrogen peroxide (produced during DA oxidation) is catalyzed by iron ions, we were surprised that we did not see an increase in 34DHB production (average ratio 0.0003, 0.0002 and 0.0003 following the MPP⁺ challenge in the iron control, vitamin E and Trolox group, respectively, Figure 4B).

MPP⁺ group : Intrastratial microdialysis with MPP⁺ (5 mM) in normal rats caused a significant increase in DA efflux and extracellular 2,3-dihydroxybenzoate concentrations, the hydroxyl radical adduct of salicylate as demonstrated by Wu et al.⁽²²⁾. In our protocol, intranigral injection of MPP⁺ tended to increase basal 34DHB production (average ratio in the equilibration period of the microdialysis was 0.0009, 0.0002 and 0.0003 for MPP⁺, saline and iron groups, respectively, Figures 4C, 4A and 4B). The MPP⁺ challenge resulted in a variable increase in the 34DHB/4HBZ ratio only in rats pre-treated with MPP⁺ suggesting oxidative stress as previously observed⁽²⁵⁾ (average ratio post MPP⁺ challenge of 0.0042 compared to 0.0006 and 0.0008 in the MPP⁺, vitamin E + MPP⁺ and Trolox + MPP⁺ group, respectively, Figure 4C). These results demonstrate once again that antioxidant pretreatment tended to decrease the ratio and inhibit the increase observed post MPP⁺ challenge, consistent with some neuroprotection (Figure 4C).

DISCUSSION

There is considerable evidence that oxidative stress is implicated in the etiology of IPD^(9;26-29). We have compared two neurotoxic agents in a rat model of IPD. The first agent was the neurotoxin MPP⁺ which has been shown to act via two mechanisms. The first mechanism involves increased oxidative stress through the production of hydrogen peroxide from DA via either enzymatic or non-enzymatic reactions⁽⁴⁾. The second is due to the inhibition of Complex I of the respiratory chain which decreases ATP production also resulting in increased free radical production^(30;31). The second agent was an iron salt which can increase oxidative stress by increasing the amount of free iron ions available for catalysis of hydrogen peroxide degradation to hydroxyl radical. This should have little or no effect on the respiratory chain.

Our data on MPP⁺-induced DA release show that both iron and MPP⁺ caused similar damage to the nigro-striatal pathway (MPP⁺ versus iron, $p=0.15$). It has been shown that DA may become neurotoxic and induce increased oxidative stress⁽²⁶⁾. However, one week after treatment with either iron or MPP⁺, only MPP⁺ induced somewhat higher basal levels of hydroxyl radical production (34DHB/4HBZ ratio increased by 84%, representative of oxidative stress) which was further increased following the MPP⁺ challenge. These data are consistent with iron causing acute permanent damage without chronic free radical production, while MPP⁺, once introduced into susceptible neurons, institutes a continuous stress resulting in a cumulative injury. This on-going process would suggest that MPP⁺ toxicity is greater than ferric chloride toxicity. Can we discern whether MPP⁺-induced oxidative stress is due to DA oxidation or to inhibition of the respiratory chain? The answer is possibly likely through both mechanisms.

Surprisingly, intranigral ferric chloride did not produce an increase in 34DHB production as measured by 34DHB/4HBZ in microdialysis samples. Possibly, pretreatment with antioxidant conferred some protection as seen in the control groups. The lack of effect of pretreatment with iron alone on the 34DHB/4HBZ ratio may reflect the decrease in release of DA whose oxidation has been shown to increase hydroxyl radical production⁽²⁶⁾. It is also consistent with a lack of transport of iron ions from the injection site to the striatum, the site of microdialysis. This could also reflect that iron produced damage to the nigro-striatal pathway without increasing oxidative stress. This suggests that iron ions, while locally neurotoxic, do not readily diffuse and hence do not increase free radical production at a distance.

The third aim of this study was to test the neuroprotective effects of co-injection of two antioxidants, vitamin E or Trolox in both the iron and MPP⁺ model. Co-administration of antioxidants should counteract transient oxidative damage, which is what we see with iron where DA release in the two antioxidant groups (Figure 2B) is the same as controls. The protective effects of vitamin E and to some extent Trolox were less pronounced in the MPP⁺ group. The fact that Trolox was somewhat more effective than vitamin E against MPP⁺ neurotoxicity possibly indicates that the free radical processes induced by MPP⁺ are more important in the hydrophilic regions of cell (e.g. interior of mitochondria). The antioxidants were only minimally effective in the MPP⁺ group suggesting that either i) processes other than oxidative stress contribute more to neurotoxicity (eg decreased ATP production) or ii) that MPP⁺ initiates an on-going process that exhausts the

antioxidant supply resulting in damage. A study by Beal and colleagues demonstrated neurorescue when N-tert-butyl- α -(2-sulphophenyl)-nitron (S-PBN) (200 mg/kg/day), a free radical spin trapping agent, was given 1 week after injection of MPP⁺, suggesting that the latter is the case. Schulz et al. have also demonstrated that S-PBN had significant neuroprotective effects against mild MPTP-induced neurotoxicity in rats, as defined by 30% depletion in DA levels following four doses of 10 mg MPTP intraperitoneally⁽³³⁾. (MPTP is oxidized to MPP⁺ via the enzyme monoamine oxidase B). While MPP⁺/MPTP models of IPD are consistent with an on-going process, it is not clear that this is the case in the human pathology.

It has been demonstrated convincingly in recent years that neurological dysfunction with degenerative lesions in the spinal cord can develop in chronic vitamin E deficiency⁽³⁴⁾. Although IPD is not caused by altered nutrition, it responds favorably to a combination of specific therapy and dietary manipulations. There is widespread agreement that vitamin E can function as an antioxidant to protect cellular membranes from oxidative damage. Most of the evidence for this function has been obtained from *in vitro* experiments, but there are also data that show that tocopherols have antioxidant properties *in vivo*. A study using high doses of vitamin E has demonstrated a positive effect on retarding IPD progression⁽³⁷⁾. Another clinical study indicated that vitamin E might have a positive effect on retarding the natural progression of IPD⁽³⁸⁾. However, a major study entitled Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapy of Parkinsonism (DATATOP) was conducted in the late '80's. One of the conclusions of this study demonstrated a lack of efficacy of antioxidants in retarding the need for L-DOPA treatment in patients with recently diagnosed IPD⁽³⁵⁾. However, this study was terminated prematurely due to the positive response to Deprenyl (an MAO-B

inhibitor). It is possible that vitamin E would have been effective over a longer time period (due to its slow entry to the brain). A dose-response study with IPD patients designed to correlate α -tocopherol levels in serum and CSF with different doses of vitamin E showed that 5 months supplementation did not increase CSF levels⁽³⁶⁾. A number of diet recall studies have demonstrated a positive correlation between dietary intake of antioxidants and decreased incidence of IPD.

The Rotterdam study of an aging population was able to show through diet recall surveys, that there was an inverse relationship between the consumption of vitamin E-rich foods and IPD, suggesting a protective effect⁽¹⁰⁾. A weaker inverse association between β -carotene and ascorbic acid intake and IPD has also been observed⁽¹¹⁾. Perhaps pertinent to these observations is the consideration that vitamin E in particular and a diet rich in fruits and vegetables in general represent preventive measures rather than therapeutic interventions due to their relatively slow accumulation. Symptoms of IPD appear only when 80% of dopaminergic neurons in the nigro-striatal pathway are lost. The strain to compensate on the remaining neurons imposes an oxidative stress that would be difficult to counteract via nutritional means alone. Diets rich in antioxidants may be more effective in preventing IPD by slowing the rate of destruction of dopaminergic neurons in susceptible individuals.

In conclusion, using rat models of IPD, we have demonstrated that both MPP⁺ and iron caused damage to the nigro-striatal pathway whereas only the MPP⁺ model appeared to result in continued oxidative stress, consistent with an on-going process. As it is believed that there is continual loss of dopaminergic neurons in IPD, it would appear that MPP⁺ represents a better model. The modest effect of antioxidant

intervention in our study suggests that a multiple dosing régime would be more effective to counteract the continuous stress.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Medical Research Council of Canada and the Heart and Stroke Foundation of Canada for their financial support.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 : Body weight variation one week after intranigral injections of toxins and/or antioxidants.

FIGURE 2: One week following intranigral injections, striatal dopamine (DA) concentration (pmol/sample) was measured during microdialysis in the saline control groups (A), iron groups (B) and MPP⁺ groups (C). The arrow indicates the time at which a 15 min infusion of MPP⁺ (5 mM) was begun.

FIGURE 3: One week following intranigral injections, striatal 3,4-dihydroxyphenylacetate (DOPAC) (pmol/sample) was measured during microdialysis in the saline control groups (A), iron groups (B) and MPP⁺ groups (C). The arrow indicates the time at which a 15 min infusion of MPP⁺ (5 mM) was begun.

FIGURE 4 : One week following intranigral injections, striatal 3,4-dihydroxybenzoate/4-hydroxybenzoate (34DHB/4HBZ) ratio during microdialysis was calculated for the saline control groups (A), iron groups (B) and MPP⁺ groups (C). The arrow indicates the time at which a 15 min infusion of MPP⁺ (5 mM) was begun.

References

1. Youdim MBH, Riederer P. Understanding Parkinson's disease. *Scientific American* 1997;52-59.
2. De Michele G, Filla A, Volpe G, Gogliettino A, Ambrosio G, Campenella G. Etiology of Parkinson's disease: the role of environment and heredity. *Adv.Neurol.* 1996;69:19-24.
3. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 1989;52:381-389.
4. Gerlach M, Riederer P, Youdim MBH. Molecular mechanisms for neurodegeneration: synergism between reactive oxygen species, calcium, and excitotoxic amino acids. *Adv.Neurol.* 1996;69:177-194.
5. Riederer P, Dirr A, Goetz M, Sofic E, Jellinger K, Youdim MBH. Distribution of iron in different brain regions and subcellular compartments in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1992;32:S101-S104
6. Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmair G, Riederer P, Stachelberger H, Ben-Shachar D, Youdim MBH. Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an X-ray microanalysis. *J.Neurochem.* 1992;59:1168-1171.
7. Church WH, Ward VL. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: Effect on dopamine oxidation. *Brain Res.Bull.* 1994;33:419-425.
8. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free Rad.Biol.Med.* 1997;22:359-378.
9. Gutteridge JMC. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Annals N.Y.Acad.Sci.* 1994;738:201-213.

10. de Rijk MC, Breteler MMB, den Breeijen JH, den Breeijen JH, Launer LJ, Grobbee DE, van der Meche FGA, Hofman A. Dietary antioxidants and Parkinson's disease. *Arch.Neurol.* 1997;54:762-765.
11. Hellenbrand W, Seidler A, Boeing H, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Oertel WH, Schneider E, Ulm G. Diet and Parkinson's disease I: a possible role for the past intake of specific foods and food groups. *Neurology* 1996;47:636-643.
12. Ste-Marie L, Boismenu D, Vachon L, Montgomery J. Evaluation of sodium 4-hydroxybenzoate as an hydroxyl radical trap using gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochem.* 1996;241:67-74.
13. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic co-ordinates. 2nd ed ed. Toronto: Academic Press, 1986.
14. Montgomery J, Ste-Marie L, Boismenu D, Vachon L. Hydroxylation of aromatic compounds as indices of hydroxyl radical production: a cautionary note revisited. *Free Rad.Biol.Med.* 1995;19:927-933.
15. Fallon J, Matthews RT, Hyman BT, Beal MF. MPP⁺ produces progressive neuronal degeneration which is mediated by oxidative stress. *Exp.Neurol.* 1997;144:193-198.
16. Ben-Shachar D, Youdim MBH. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical parkinsonism in rats. *J.Neurochem.* 1991;57:2133-2135.
17. Rahuala P, Lin AMY, Chiueh CC. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopaminergic neurons from oxidative stress. *Faseb J.* 1998;12:165-173.
18. Joseph JA, Villalobos-Molina R, Denisova N, Erat S, Cutler R, Strain J. Age differences in sensitivity to H₂O₂- or NO-induced reductions in K⁺-evoked dopamine release from superfused striatal

- slices: reversals by PBN or Trolox. *Free Rad.Biol.Med.* 1996;20:821-830.
19. Wu R-M, Murphy DL, Chiueh CC. Neuronal protective and rescue effects of deprenyl against MPP⁺ dopaminergic toxicity. *J.Neural Transm.* 1995;100:53-61.
 20. Giovanni A, Sieber B-A, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: systemic administration. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994;270:1000-1007.
 21. Giovanni A, Sonsalla PK, Heikkila RE. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994;270:1008-1014.
 22. Wu R-M, Mohanakumar KP, Murphy DL, Chiueh CC. Antioxidant mechanism and protection of nigral neurons against MPP⁺ toxicity by Deprenyl (Selegiline). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994;738:214-221.
 23. Rollema H, Skolnik M, D'Engelbronner J, Igarashi K, Usuki E, Castagnoli N. MPP⁺-like neurotoxicity of a pyridinium metabolite derived from Haloperidol: *in vivo* microdialysis and *in vitro* mitochondrial studies. *J.Pharmacol.Exp.Therapeutics* 1994;268:380-387.
 24. Althaus JS, Andrus PK, Williams CM, VonVoigtlander PF, Cazers AR, Hall ED. The use of salicylate hydroxylation to detect hydroxyl radical generation in ischemic and traumatic brain injury. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1993;20:147-162.
 25. Tipton KF, Singer TP. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J.Neurochem.* 1993;61:1191-1201.

26. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996;47:S161-S170
27. Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AHV, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Ann.Neurol.* 1992;32:S82-S87
28. Yoshikawa T. Free radicals and their scavengers in Parkinson's disease. *Eur.Neurol.* 1993;33:60-68.
29. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1996;36:83-106.
30. Poirier J, Thiffault C. Are free radicals involved in the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease? *Eur.Neurol.* 1993;33:38-43.
31. Granner DK, Mayes PA, Murray RK, Rodwell VW. *Précis de biochimie.* 7 ed. Québec: Eska, 1989.
32. Srivastava R, Brouillet E, Beal MF, Storey E, Hyman BT. Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. *Neurobiol.Aging* 1993;14:295-301.
33. Schulz JB, Henshaw DR, Matthews RT, Beal F. Coenzyme Q₁₀ and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp.Neurol.* 1995;132:279-283.
34. Farrell PM, Roberts RJ. Vitamin E. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern nutrition in health and disease.* 8th ed. Malvern: 1994:326-341.
35. Parkinson study group. DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. *Arch.Neurol.* 1989;46:1052-1059.
36. Pappert EJ, Tangney CC, Goetz CG, Ling ZD, Lipton JW, Stebbins GT, Carvey, PM. Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal

- fluid of Parkinson's disease patients: dose-response study and correlations with plasma levels. *Neurology* 1996;47:1037-1042.
37. Fahn S. A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1992;32:S128-S132
38. Factor SA, Sanchez-Ramos JR, Weiner WJ. Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 1990;53:457-461.

Figure 1

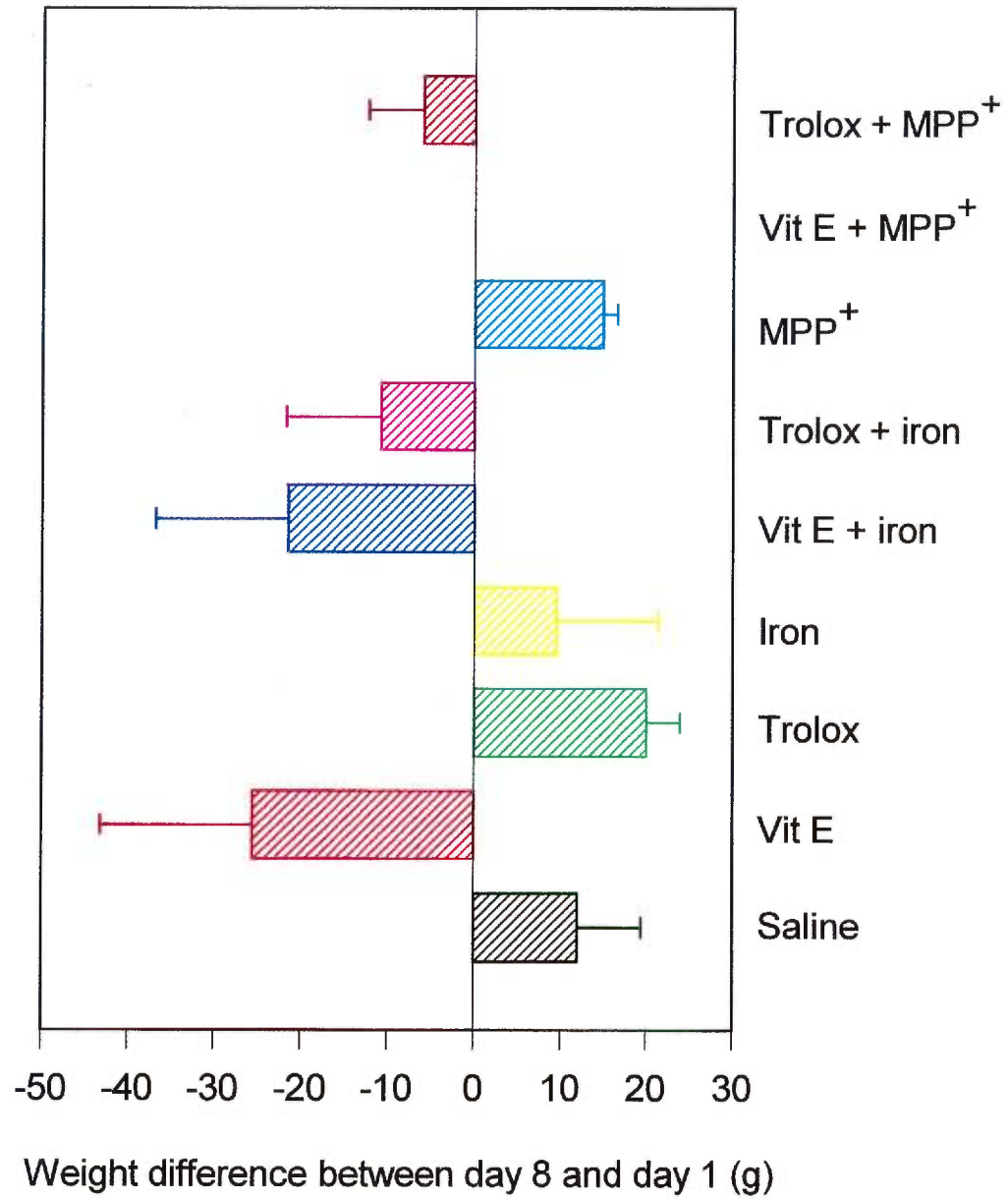


Figure 2

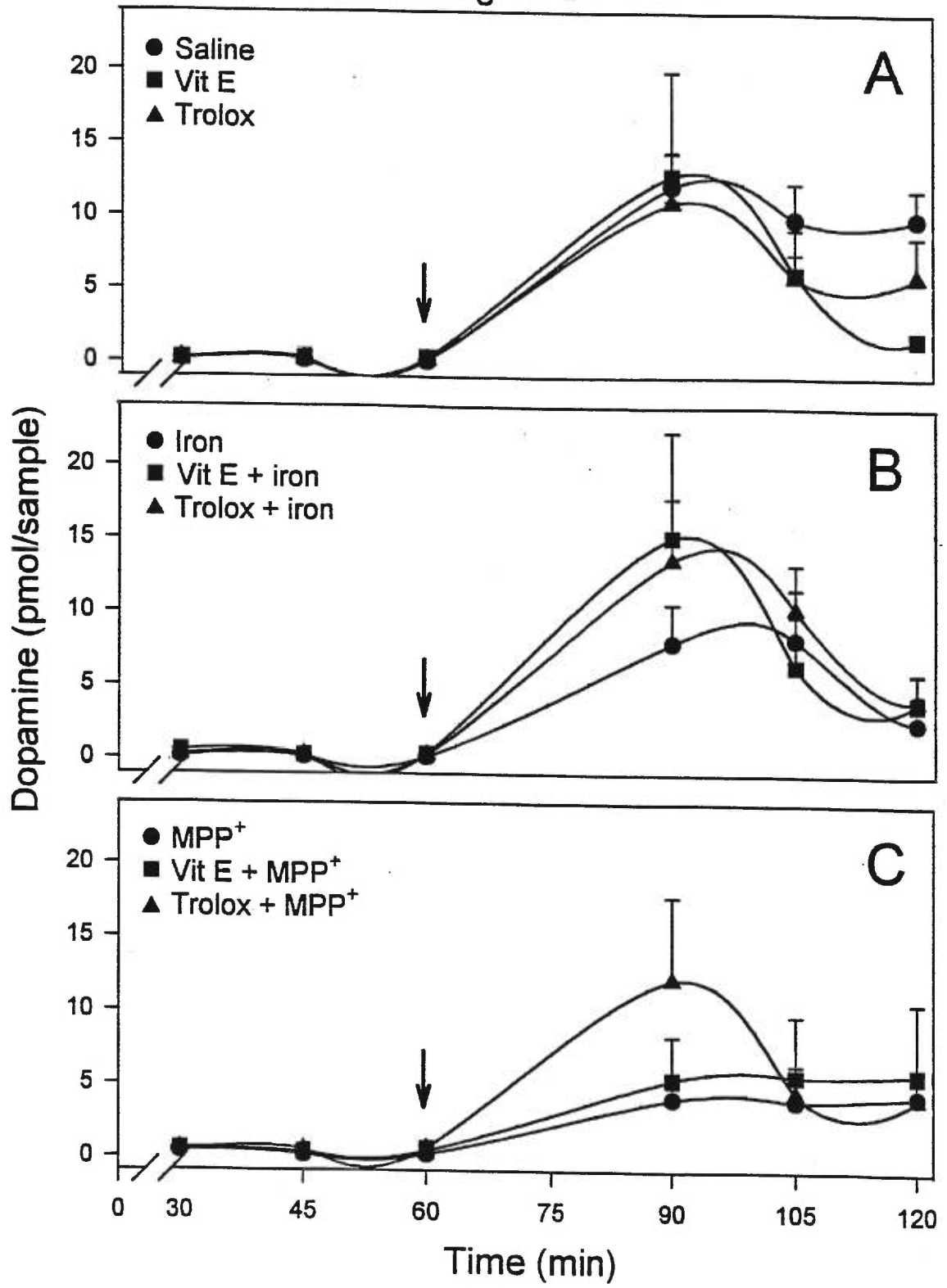


Figure 3

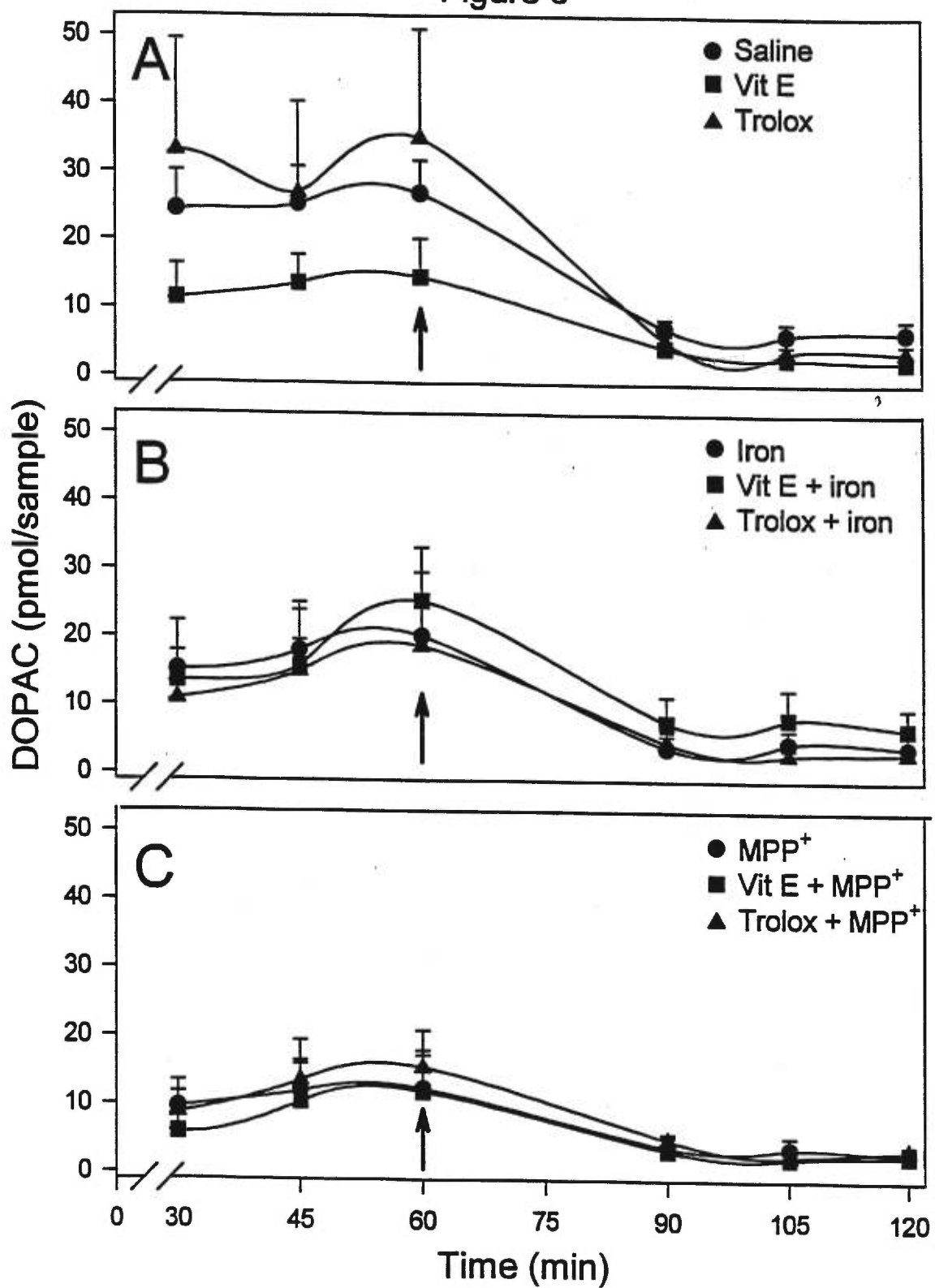
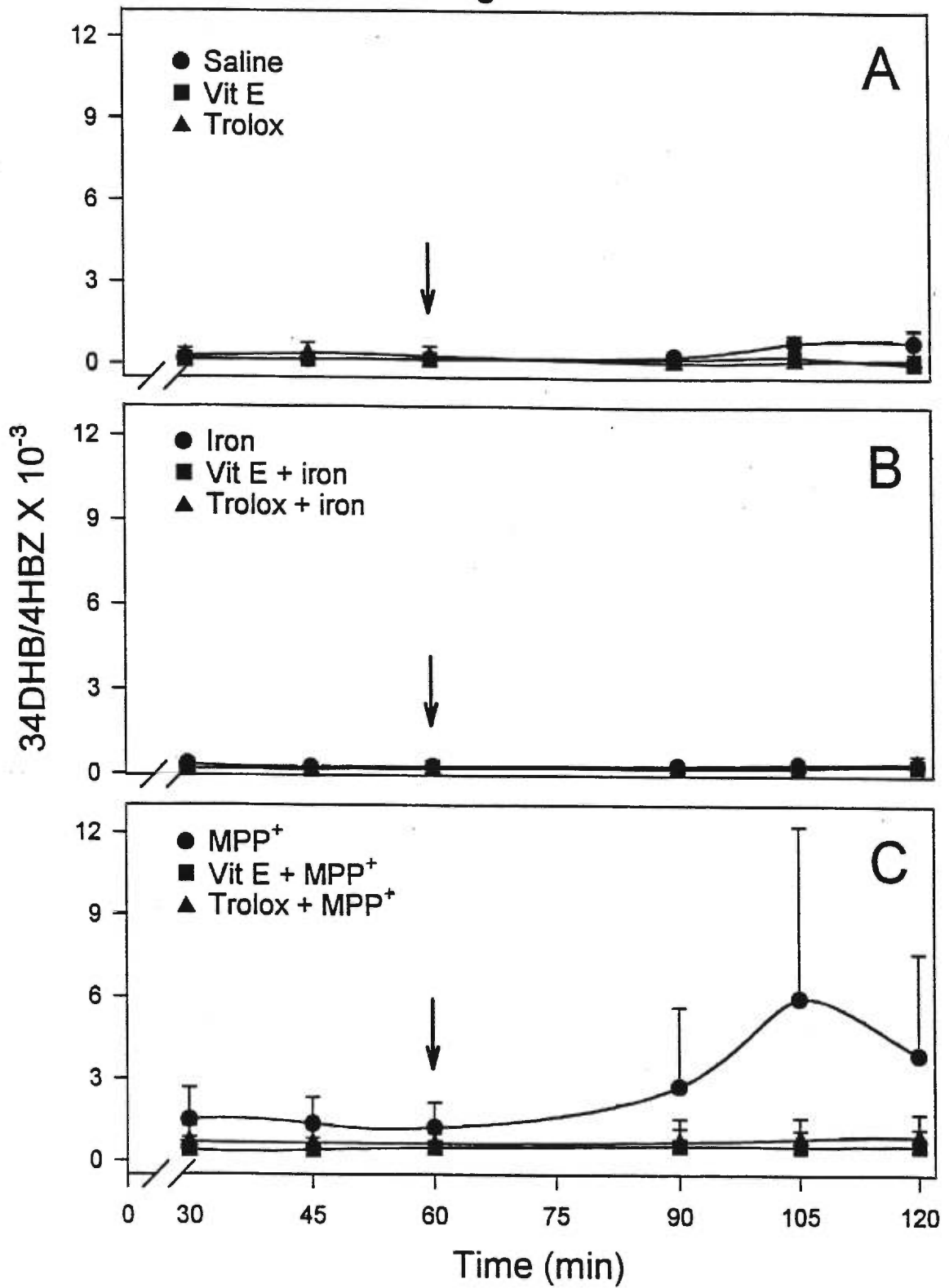


Figure 4



Chapitre trois
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

3. Discussion et conclusion générale

Dans le but d'élucider la notion de stress oxydatif et de neuroprotection dans la maladie de Parkinson, ce projet de maîtrise a été conçu en regard de trois interrogations majeures. Tout d'abord, est-ce que l'injection intranigrale du MPP⁺ ou du fer induit le même dommage à la voie nigro-striée? Cet aspect fut évalué par la libération de la DA striatale lors du challenge MPP⁺. Ensuite, étant donné un dommage neuronal semblable, est-ce que le MPP⁺ ou le fer entraînent une augmentation du stress oxydatif à distance et dans le temps? Le ratio 34DHB/4HBZ fut utilisé comme indice de stress oxydatif. Finalement, est-ce que la co-administration d'antioxydants (vitamine E ou Trolox) protège contre un dommage neuronal accru et/ou un stress oxydatif augmenté?

L'établissement des modèles de toxicité et de neuroprotection qui ont servi à notre projet de recherche est le fruit d'une longue démarche. Tout d'abord, nous avons tenté de mettre sur pied un modèle de toxicité chez le rat avec le salsolinol, une TIQ. Ce composé injecté dans la SN est capable d'induire des dommages neuronaux semblables à ceux de MPP⁺ (section 2.4.7). Des problèmes techniques ont entraîné des résultats non concluants. En effet, le fait que le salsolinol se dégradait lorsque mis en contact avec la sonde de microdialyse rendait l'analyse des composés impossible. Nous avons ensuite entrepris d'injecter du peroxyde d'hydrogène (oxydant) dans la substance noire de rats. Ceci était dans le but d'entraîner un stress oxydatif puisque le peroxyde d'hydrogène est formé à partir de la DA (de façon enzymatique ou non) et entraîne la production de radicaux libres. Les résultats furent également décevants. Des essais ont ensuite été effectués avec différentes doses de MPP⁺ et de FeCl₃. Des injections de MPP⁺ (100

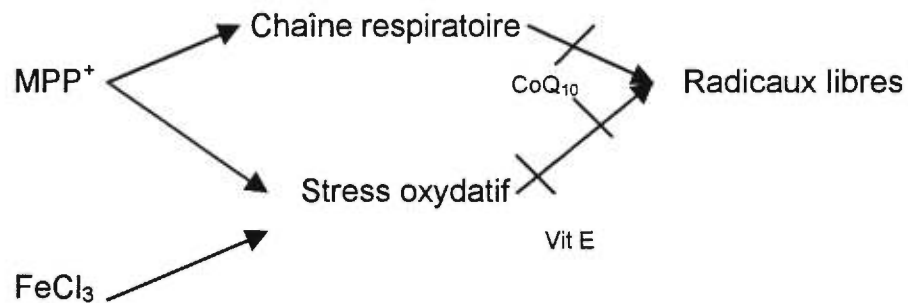
nmol) ou de FeCl_3 (100 nmol) ont entraîné une diminution de la dopamine striatale de 50%. Nous avons donc trouvé nos modèles de parkinsonisme chez le rat.

Dans le but de diminuer le nombre d'animaux nécessaires au projet de recherche et pour des raisons éthiques, nous avons tout d'abord tenté d'effectuer une injection de toxine ou d'oxydant dans chacune des hémisphères du rat. Les animaux ainsi traités perdaient plus de 20% de leur masse corporelle initiale tout au long de la semaine. Nous avons donc opté pour l'injection intranigrale ou intrastriatale dans un seul hémisphère à la fois.

Étant donné que des études effectuées par certains groupes de scientifiques ont démontré un transport rétrograde du striatum à la substance noire de $\text{MPP}^{+(87)}$, nous avons opté pour l'injection intrastriatale de MPP^+ . Cette procédure diminuait ainsi les risques associés à l'injection intranigrale (atteinte de noyaux des centres respiratoires par exemple). Nous avons essayé d'injecter le FeCl_3 dans le striatum afin de vérifier la présence ou non d'un transport rétrograde (comme le MPP^+). Les résultats ont démontré l'absence d'un tel transport, les concentrations de dopamine striatale demeurant inchangée. Nous avons donc établi un protocole incluant l'injection intrastriatale de MPP^+ et l'injection intranigrale de FeCl_3 .

Une fois les modèles de toxicité établis, il nous fallait trouver les substances nous servant de neuroprotection probable dans ces modèles. Nous voulions idéalement comparer l'effet neuroprotecteur de la vitamine E (antioxydant reconnu) avec celui du CoQ_{10} . Le choix de ces substances s'était fait à la lumière de leur action spécifique sur le métabolisme. La vitamine E est employée comme antioxydant pur

agissant contre l'effet oxydant du FeCl_3 et contre l'effet oxydant partiel de MPP^+ . Le CoQ_{10} est utilisé pour sa double action soit, son effet antioxydant (FeCl_3 et MPP^+) et son effet comme transporteur de la chaîne respiratoire (MPP^+ seulement). Le schéma suivant représente ce concept :



Malheureusement, les essais effectués avec le CoQ_{10} ont posé plusieurs problèmes d'ordre technique comme la difficulté de solubilisation du produit et la perte de poids relativement grande engendrée chez les animaux. Ceci nous a forcé à abandonner cette avenue. Nous avons ainsi décidé d'orienter notre étude vers un autre antioxydant, l'analogue hydrosoluble de la vitamine E, le Trolox. Le choix de cet antioxydant de type « vitamine E » s'est fait surtout pour la capacité du Trolox de se loger dans les compartiments cellulaires différents de ceux de la vitamine E.

La microdialyse était notre principale technique d'échantillonnage. Nous avons tout de même effectué des homogénats de cerveaux afin de corroborer les résultats des microdialyses. Les cerveaux des rats étaient isolés, congelés et conservés à -80°C immédiatement après la microdialyse. Les homogénats de cerveau permettent de déterminer la

quantité de la substance d'intérêt une semaine après les injections intranigrale ou intrastriatale. Une coupe de cerveau est effectuée à un endroit prédéterminé. La coupe est homogénéisée dans une solution tampon et l'analyse de l'homogénat se fait par HPLC-EC. La région et l'épaisseur de la coupe sont des facteurs cruciaux pour l'analyse des métabolites. Une petite variation dans la direction rostrale-caudale peut changer la quantité des catécholamines retrouvées dans les homogénats. Étant donné l'interprétation difficile des résultats d'homogénats, nous nous sommes concentrés sur les données de microdialyses.

Un concept important est celui de l'installation progressive de la maladie versus un événement qui se produit de façon transitoire et tue ou endommage les neurones⁽²⁶⁾. Nos résultats démontrent qu'autant le MPP⁺ que le fer entraînent un dommage à la voie nigro-striée. Cependant, une semaine après les injections, seul le MPP⁺ entraîne une légère augmentation du ratio 34DHB/4HBZ, représentatif de la production continue du radical hydroxyle. Ces données suggèrent que le fer entraîne un dommage neuronal immédiat et permanent tandis que le MPP⁺, une fois introduit dans les neurones susceptibles, induit un stress continu indiquant un processus chronique. Ce dernier implique la possibilité de développer des interventions nutritionnelles afin de ralentir ou d'arrêter la dégénérescence de la voie nigro-striée.

Des études rétrospectives ont démontré une relation inverse entre la consommation d'aliments riches en vitamine E et l'incidence de la maladie de Parkinson⁽⁷⁹⁾. De plus, une étude clinique a démontré un effet positif de la vitamine E en ce qui a trait au ralentissement de la progression du parkinsonisme⁽⁸¹⁾. La réponse positive aux injections du

GSH chez les parkinsoniens supporte un rôle du stress oxydatif dans l'étiologie de la maladie⁽⁸²⁾.

Les antioxydants (vitamine E et Trolox) ont été moins efficaces contre les effets du MPP⁺ que ceux du fer. Ceci suggère que possiblement d'autres processus contribuent à la neurotoxicité (production diminuée d'ATP) ou que le MPP⁺ initie un processus chronique qui épuise les réserves exogènes d'antioxydants. Beal et coll. ont démontré que le N-tert-butyl- α -(2-sulfophényl)-nitrone (S-PBN), un piègeur de radicaux libres, introduit une semaine après l'injection de MPP⁺, entraînait la sauvegarde des neurones⁽²⁶⁾. Ceci appuie une fois de plus l'hypothèse de l'installation progressive du dommage infligé par le MPP⁺. Cependant, à l'heure actuelle, la question d'un processus versus un événement dans la perte neuronale chez les parkinsoniens n'est pas claire.

Dans notre étude, le fait que le Trolox est légèrement plus efficace contre la neurotoxicité de MPP⁺ suggère que les processus oxydatifs sont plus importants dans les régions hydrophiles des cellules (intérieur de la mitochondrie par exemple). Cependant, le nombre limité d'animaux nous empêche de tirer des conclusions précises.

Les résultats de ce projet de recherche permettent de croire qu'il serait valable et souhaitable d'approfondir certains aspects reliés à la maladie de Parkinson.

Tout d'abord, il serait intéressant d'évaluer l'effet neuroprotecteur de l'administration des antioxydants de façon chronique dans le modèle MPP⁺ animaux de parkinsonisme étant donné les évidences d'un processus continu. Par exemple, l'antioxydant (vitamine E, Trolox,

acide lipoïque) pourrait être administré de façon intrapéritonéale et répétitive deux à quatre semaines avant ou après l'insulte oxydative. Ceci permettrait d'évaluer la notion de prévention ou de traitements contre un processus continu dans la maladie de Parkinson. De plus, l'administration des antioxydants de façon plus physiologique, comme par injection intrapéritonéale ou *per os*, permettrait plus facilement une extrapolation chez l'humain.

Il serait également important d'investiguer une thérapie de la maladie de Parkinson impliquant l'action d'un facteur de croissance (GDNF par exemple) puisque l'administration d'une telle protéine au système nerveux central protège les neurones dopaminergiques des insultes neurotoxiques et les stimule afin de mieux performer⁽⁸⁸⁾.

En terminant, si le stress oxydatif est démontré de façon convaincante comme un facteur causant la maladie de Parkinson lors d'études fondamentales, les études chez l'humain deviennent primordiales. Ce projet de recherche, impliquant des études fondamentales, offre des possibilités en ce qui a trait à d'éventuelles études cliniques. Ces dernières permettraient l'application chez l'humain des principes fondamentaux décrits dans ce mémoire, ceci dans le but d'améliorer la qualité de vie des gens atteints de la maladie de Parkinson.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Youdim MBH, Riederer P. Understanding Parkinson's disease. *Scientific American* 1997;52-59.
2. Wakabayashi K, Takahashi H. Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur.Neurol.* 1997;38:2-7.
3. Golbe LI, Farrell MF, Davis PH. Case-control study of early life dietary factors in Parkinson's disease. *Arch.Neurol.* 1988;45:1350-1353.
4. Agid Y. Mécanismes de la mort cellulaire dans les affections neurodégénératives: à propos de la maladie de Parkinson. *C.R.Soc.Biol.* 1993;187:37-46.
5. Uitti RJ, Calne DB. Pathogenesis of idiopathic parkinsonism. *Eur.Neurol.* 1993;33:6-23.
6. De Michele G, Filla A, Volpe G, Gogliettino A, Ambrosio G, Campenella G. Etiology of Parkinson's disease: the role of environment and heredity. *Adv.Neurol.* 1996;69:19-24.
7. Calne DB. Is idiopathic parkinsonism the consequence of an event or a process? *Neurology* 1994;44:5-10.
8. Pujol J, Junqué C, Vendrell P, Grau JM, Capdevila A. Reduction of the substantia nigra width and motor decline in aging and Parkinson's disease. *Arch.Neurol.* 1992;49:1119-1122.
9. Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 1991;337:1321-1324.
10. Spence AP, Mason EB. Anatomie et physiologie: une approche intégrée. Editions du renouveau pédagogique ed. Ottawa: 1983.
11. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free Rad.Biol.Med.* 1997;22:359-378.

12. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996;47:S161-S170
13. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996;274:1197-1199.
14. Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. *Hum.Mol.Gen.* 1997;6:1687-1691.
15. Scheider WL, Hershey LA, Vena JE, Holmlund T, Marshall JR, Freudenheim JL. Dietary antioxidants and other dietary factors in the etiology of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 1997;12:190-196.
16. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The biochemical basis of neuropharmacology. Seventh edition New York: 1996.
17. Offen D, Ziv I, Barzilai A, et al. Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochem.Int.* 1997;31:207-216.
18. Chatellard-Causse C, Feuerstein C. La dégénérescence des neurones catécholaminergiques. *Path.Biol.* 1995;43:577-580.
19. Pezzella A, d'Ischia M, Napolitano A, Misuraca G, Prota G. Iron-mediated generation of the neurotoxin 6-hydroxydopamine quinone by reaction of fatty acid hydroperoxides with dopamine: a possible contributory mechanism for neuronal degeneration in Parkinson's disease. *J.Med.Chem.* 1997;40:2211-2216.
20. Yoshikawa T. Free radicals and their scavengers in Parkinson's disease. *Eur.Neurol.* 1993;33:60-68.
21. Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res.Rev.* 1997;25:335-358.

22. Tipton KF, Singer TP. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J.Neurochem.* 1993;61:1191-1201.
23. Langston JW. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;219:979-980.
24. Restak RM. Receptors-Double agents. Bantam books ed. 1994.
25. Gerlach M, Riederer P, Youdim MBH. Molecular mechanisms for neurodegeneration: synergism between reactive oxygen species, calcium, and excitotoxic amino acids. *Adv.Neurol.* 1996;69:177-194.
26. Fallon J, Matthews RT, Hyman BT, Beal MF. MPP⁺ produces progressive neuronal degeneration which is mediated by oxidative stress. *Exp.Neurol.* 1997;144:193-198.
27. Collins MA. Potential parkinsonism protoxicants within and without. *Neurobiol.Aging* 1994;15:277-278.
28. Matsubara K, Kobayashi S, Kobayashi Y, et al. β -carbolinium cations, endogenous MPP⁺ analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1995;45:2240-2245.
29. Neafsey EJ, Albores R, Gearhart D, et al. Methyl- β -carbolinium analogs of MPP⁺ cause nigrostriatal toxicity after substantia nigra injections in rats. *Brain Res.* 1995;675:279-288.
30. Fields JZ, Albores R, Neafsey EJ, Collins MA. Similar inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺) and by a unique N-methylated beta-carboline analogue, 2,9-dimethyl-norharman (2,9Me₂NH). *Ann.N.Y.Acad.Sc.* 1992;272-274.
31. Martin Wayne WR, Stoessl AJ, Adam MJ, et al. Positron emission tomography in Parkinson's disease: glucose and DOPA metabolism. *Adv.Neurol.* 1986;45:95-98.

32. Niwa T, Yoshizumi H, Tatematsu A, Matsuura S, Nagatsu T. Presence of tetrahydroisoquinoline, a parkinsonian-related compound, in foods. *J.Chromatogr.* 1989;493:347-352.
33. Naoi M, Maruyama W, Dostert P, et al. Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res* 1996;709:285-295.
34. Maruyama W, Dostert P, Matsubara K, Naoi M. N-methyl(R)salsolinol produces hydroxyl radicals: involvement to neurotoxicity. *Free Rad.Biol.Med.* 1995;19:67-75.
35. Maruyama W, Abe T, Tohgi H, Dostert P, Naoi M. A dopaminergic neurotoxin, (R)-N-methylsalsolinol, increases in parkinsonian cerebrospinal fluid. *Ann.Neurol.* 1996;40:119-122.
36. Naoi M, Matsuura S, Takahashi T, Nagatsu T. A N-methyltransferase in human brain catalyses N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methylisoquinolinium ion. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1989;161:1213-1219.
37. Maruyama W, Sobue G, Matsubara K, Hashizume Y, Dostert P, Naoi M. A dopaminergic neurotoxin, 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl(R)salsolinol, and its oxidation product, 1,2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, accumulate in the nigro-striatal system of the human brain. *Neurosci.Letters* 1997;223:61-64.
38. Gutteridge JMC. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Annals N.Y.Acad.Sci.* 1994;738:201-213.

39. Poirier J, Thiffault C. Are free radicals involved in the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease? *Eur.Neurol.* 1993;33:38-43.
40. Granner DK, Mayes PA, Murray RK, Rodwell VW. *Précis de biochimie.* 7 ed. Québec: Eska, 1989.
41. Mizuno Y, Ikebe S, Hattori N, et al. Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochem.Biophys.Acta* 1995;1271:265-274.
42. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative disease. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1996;36:83-106.
43. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 1989;52:381-389.
44. Kuno S. Differential therapeutic effects of dopamine D1 and D2 agonists in MPTP-induced parkinsonian monkeys: clinical implications. *Eur.Neurol.* 1997;38:18-22.
45. Calne DB. The free radical hypothesis in idiopathic parkinsonism: evidence against it. *Ann.Neurol.* 1992;32:799-803.
46. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1998;95:675-680.
47. Ziv I, Melamed E, Nardi N, et al. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons - a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosc.Letters* 1994;170:136-140.
48. Duke RC, Ojcius DM, Ding-E Young J. Cell suicide in health and disease. *Scientific American* 1996;80-87.

49. Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. Global ischemia activates nuclear factor- κ B in forebrain neurons of rats. *Stroke* 1997;28:1073-1081.
50. Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero M-T, et al. Expression of Bcl-2 in adult human brain regions with special reference to neurodegenerative disorders. *J.Neurochem.* 1997;69:223-231.
51. Roy S, Roy G. L'apoptose. *Recherche* 1996;29-34.
52. Stern G. Parkinson's disease: the apoptosis hypothesis. *Adv.Neurol.* 1996;69:101-107.
53. Hirsch EC. Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann.Neurol.* 1992;32:S88-S93
54. Buettner GR. Antioxidant enzymes and function. *Oxygen '98 - Sunrise Free Radical School* 1998;November 20-23, 1998 Washington D.C.:
55. de la Torre MR, Casado A, Lopez-Fernandez ME, et al. Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes. *Neurochem.Res.* 1997;21:885-888.
56. Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, et al. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochem.Biophys.Acta* 1997;1362:77-86.
57. Trepanier G, Furling D, Puymirat J, Mirault ME. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience* 1996;75:231-243.
58. Shin SM, Razdan B, Mishra OP, Johnson L, Delivoria-Papadopoulos M. Protective effect of α -tocopherol on brain cell membrane function during cerebral cortical hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 1994;653:45-50.

59. Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res.Bull.* 1992;29:699-701.
60. Palozza.P., Krinsky NI. β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch.Biochem.Biophys.* 1992;297:184-187.
61. Shults CW, Hass RH, Passov D, Beal F.M. Coenzyme Q₁₀ levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann.Neurol.* 1997;42:261-264.
62. Shults CW, Beal F, Fontaine D, Nakano K, Haas RH. Absorption tolerability, and effects on mitochondrial activity of oral coenzyme Q₁₀ in parkinsonian patients. *Neurology* 1998;50:793-795.
63. Schulz JB, Henshaw DR, Matthews RT, Beal F. Coenzyme Q₁₀ and nicotinamide and a free radical spin trap protect against MPTP neurotoxicity. *Exp.Neurol.* 1995;132:279-283.
64. Murata M, Kanazawa I. Effects of chronic Levodopa therapy of Dopa pharmacokinetics. *Eur.Neurol.* 1997;38:50-55.
65. Fahn S. Controversies in the therapy of Parkinson's Disease. *Adv.Neurol.* 1996;69:477-486.
66. Ziv I, Zilkha-Falb R, Offen D, Shirvan A, Barzilai A, Melamed E. Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells—a possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? *Movement Disorders* 1997;12:17-23.
67. Walkinshaw G, Water CM. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA: implications for the treatment of Parkinson's disease. *J.Clin.Invest.* 1995;95:2458-2464.

68. Bracco F. New drugs in the treatment of Parkinson's disease: an introduction. *Adv.Neurol.* 1996;69:513-517.
69. Wu R-M, Mohanakumar KP, Murphy DL, Chiueh CC. Antioxidant mechanism and protection of nigral neurons against MPP⁺ toxicity by Deprenyl (Seligiline). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994;738:214-221.
70. Parkinson study group. Impact of Deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring Levodopa. *Ann.Neurol.* 1996;39:37-45.
71. Parkinson study group. DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. *Arch.Neurol.* 1989;46:1052-1059.
72. Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, et al. Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1997;94:8818-8823.
73. Horellou P, Sabaté O, Buc-Caron M-H, Mallet J. Adenovirus-mediated gene transfer to the central nervous system for Parkinson's disease. *Exp.Neurol.* 1997;144:131-138.
74. Fahn S. An overview of novel therapies for Parkinson's Disease. *Exp.Neur.* 1997;144:21-23.
75. Wenning GK, Odin P, Morrish P, et al. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastratial dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1997;42:95-107.
76. Baron MS, Vitek JL, Bakay RAE, et al. Treatment of advanced Parkinson's Disease by posterior GPi pallidotomy: 1-year results of a pilot study. *Ann.Neurol.* 1996;40:355-366.
77. Guyton AC. *Anatomie et physiologie du système nerveux.* Montréal: 1989.

78. Kishore A, Turnbull IM, Snow BJ, et al. Efficacy, stability and predictors of outcome of pallidotomy for Parkinson's disease: six-month follow-up with additional 1-year observations. *Brain* 1997;120:729-737.
79. de Rijk MC, Breteler MMB, den Breeijen JH, et al. Dietary antioxidants and Parkinson's disease. *Arch.Neurol.* 1997;54:762-765.
80. Factor SA, Sanchez-Ramos JR, Weiner WJ. Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 1990;53:457-461.
81. Fahn S. A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 1992;32:S128-S132
82. Sechi G, Deledda MG, Bua G, et al. Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog.Neuro-Psychopharmacol.Biol.Psychiatry* 1996;20:1159-1170.
83. Benveniste H, Jon Hansen A, Ottosen NS. Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J.Neurochem.* 1989;52:1741-1750.
84. Benveniste H, Huttemeier PC. Microdialysis-theory and application. *Prog.Neurobiol.* 1990;35:195-215.
85. Ste-Marie L, Boismenu D, Vachon L, Montgomery J. Evaluation of sodium 4-hydroxybenzoate as an hydroxyl radical trap using gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochem.* 1996;241:67-74.
86. Althaus JS, Andrus PK, Williams CM, Vonvoigtlander PF, Cazers AR, Hall ED. The use of salicylate hydroxylation to detect hydroxyl radical generation in ischemic and traumatic brain injury. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1993;20:147-162.

87. Srivastava R, Brouillet E, Beal MF, Storey E, Hyman BT. Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. *Neurobiol.Aging* 1993;14:295-301.
88. Olson L. The coming of age of the GDNF family and its receptors: gene delivery in a rat Parkinson model may have clinical implications. *Trends Neurosc.* 1997;20:277-279.